

**Untersuchungen zum Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp.:
Charakterisierung der Maltose/Maltotriose-Transportaktivitäten sowie
eines potentiellen ABC-Transporters für Acarbose**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Claudia Brunkhorst
(geb. 11.11.1969 in Soltau)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Erwin Schneider
2. PD Dr. rer. nat. T. Eitinger
3. PD Dr. rer. nat. U. Wehmeier

eingereicht am: 10.08.2004
Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2004

Publikationsliste

Brunkhorst, C., Andersen, C. and Schneider, E. (1999). Acarbose, a pseudooligosaccharide, is transported but not metabolized by the maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 2612 – 2619

Brunkhorst, C., Wehmeier, U., Piepersberg, W. and Schneider, E. (2004). The *acbH* gene of *Actinoplanes* sp. encodes a solute receptor with binding activities for acarbose and longer homologs. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Brunkhorst, C. and Schneider, E. (2004). Maltose and maltotriose transport activities in the acarbose producer *Actinoplanes* sp. Manuskript in Vorbereitung.

1. INHALTSVERZEICHNIS

Publikationsliste.....	2
1. INHALTSVERZEICHNIS.....	3
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3. ZUSAMMENFASSUNG	8
4. EINLEITUNG	9
4.1 Acarbose-Metabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp.....	9
4.2 ABC-Transportsysteme	12
4.2.1. Die strukturelle Organisation von ABC-Transportern	13
4.2.2. Bindeprotein-abhängige ABC-Importer	14
4.2.3. Maltose-Importsysteme von Prokaryoten	16
4.2.3.1. Maltose-Importsysteme von gramnegativen Bakterien.....	16
4.2.3.2. Maltose-Importsysteme von grampositiven Bakterien und Archaeen	18
4.2.4. Globale Regulationsmechanismen für Kohlenstoffquellen bei gramnegativen und grampositiven Bakterien	20
4.3. Zielstellung der Arbeit.....	22
5. MATERIAL UND METHODEN.....	23
5.1 Chemikalien, Enzyme, Isotope und Materialien	23
5.2 Bakterienstämme.....	24
5.3 Medien.....	25
5.3.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	25
5.3.2. Kultivierung von <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>Streptomyces lividans</i>	25
5.4 Lagerung und Anzucht der Stämme	26
5.4.1 Stammhaltung	26
5.4.2 Anzucht und Wachstumsbedingungen	26
5.5 Plasmide und Oligonukleotide	27
5.6 Genetische und Molekularbiologische Methoden	29
5.6.1. DNA-Präparationen	29
5.6.1.1. Plasmid-Präparationen	29
5.6.1.2. Präparation chromosomaler DNA aus <i>Actinoplanes</i> sp. 50/110 und <i>Streptomyces lividans</i>	29
5.6.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
5.6.3. DNA-Modifikationen	31
5.6.4. Ortsgerichtete Mutagenese	31
5.6.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	31
5.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten	31
5.6.7. Sequenzierungen.....	31
5.6.8. Konstruktion ausgewählter Expressionsvektoren.....	31

5.6.8.1.	Das Expressionsplasmid pCB5	31
5.6.8.2.	Das Expressionsplasmid pCB10	32
5.6.8.3.	Das Expressionsplasmid pCB11	32
5.6.8.4.	Das Expressionsplasmid pCB12	33
5.6.9.	DNA-DNA-Hybridisierung	33
5.6.9.1.	Southern Blotting	33
5.6.9.2.	Hybridisierung.....	34
5.6.9.3.	Detektion	34
5.6.9.4.	Sonden	34
5.6.10.	Transformation	34
5.6.10.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	34
5.6.10.2.	Transformation von <i>S. lividans</i>	34
5.7	Analytische und Biochemische Methoden.....	35
5.7.1.	Zellaufschluss und Zellfraktionierung	35
5.7.1.1.	Zellaufschluss in einer French Pressure Cell	35
5.7.1.2.	Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung	36
5.7.1.3.	Zellfraktionierung.....	36
5.7.2.	Präparation des Osmoschock-Überstandes	36
5.7.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
5.7.4.	Gelelektrophoretische Darstellung von Proteinen	37
5.7.5.	Proteinelution aus SDS-Polyacrylamid-Gelen	37
5.7.6.	Western Blotting und Immunodetektion	37
5.7.7.	Transportversuche.....	38
5.7.8.	Maltose-PTS-Test	39
5.7.9.	Zuckerbindungsstudien in Fällungsexperimenten	40
5.7.10.	Zuckerbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz.....	40
5.7.11.	Freisetzung von Glukose aus Acarbose.....	41
5.7.12.	Reinigung des AcbH-Proteins.....	41
5.7.13.	Renaturierung des AcbH-Proteins	42
5.7.14.	CD-Spektrum des renaturierten Proteins AcbH	42
5.7.15.	Solubilisierung des WT-AcbH aus Membranen.....	42
5.7.16.	Reinigung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins aus dem Kulturüberstand von <i>Actinoplanes</i> sp.	43
5.7.17.	Massenanalyse und Peptidsequenzierung.....	43
6.	ERGEBNISSE	44
6.1	Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von <i>Escherichia coli</i> K12.....	44
6.1.1.	Acarboseaufnahme in Zellen von <i>Escherichia coli</i> K12.....	44
6.1.2.	Interaktion von Acarbose mit dem Maltose-Bindeprotein MalE	46
6.1.3.	Acarbose als Substrat der cytoplasmatischen Enzyme MalQ und MalZ	47
6.2	Untersuchungen zur Transportkapazität von <i>Actinoplanes</i> sp.	49
6.2.1	Wachstum von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29 mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	50
6.2.2	Maltoseaufnahme in Zellen von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29	51
6.2.2.1.	Spezifität der beobachteten Maltosetransport-Aktivitäten.....	53
6.2.2.2.	Transportkinetik	55
6.2.3	Maltotrioseaufnahme in Zellen von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29	57

6.2.3.1.	Spezifität der beobachteten Maltotriose-Transport-Aktivitäten	58
6.2.4	Acarboseaufnahme in Zellen von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29	60
6.3	Identifizierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins aus dem Kulturüberstand von <i>Actinoplanes</i> sp.....	60
6.3.1	Isolierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins	61
6.3.2	Klonierung des Gens eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins	63
6.3.3	Zusammenfassung	64
6.4	Heterologe Synthese und Reinigung des Proteins AcbH	66
6.4.1	Klonierungen von <i>acbH</i>	66
6.4.2	Heterologe Synthese von AcbH in <i>S. lividans</i> TK23 und Reinigung	71
6.4.3	Heterologe Synthese von AcbH in <i>E. coli</i> und Reinigung	73
6.5	Substratbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz... ..	76
6.6	Heterologe Synthese und Reinigung der Proteine AcbFG und MsiK	79
6.6.1	Identifizierung, heterologe Synthese in <i>E. coli</i> und Reinigung von MsiK	79
6.6.2	Heterologe Ko-Synthese und Reinigung des Komplexes AcbFG-MsiK ₂	80
6.7	Immunochemische Analyse des Syntheseprofils von AcbH und MsiK in <i>Actinoplanes</i> sp.....	82
6.7.1	Das Syntheseprofil von AcbH	82
6.7.2	Das Induktionsprofil von MsiK	85
6.7.3	Zusammenfassung	86
7	DISKUSSION.....	87
7.1	Wirkung von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von <i>Escherichia coli</i> K12 und resultierende Konsequenzen für das Modell zum Acarbose-Metabolismus von <i>Actinoplanes</i> sp.	87
7.1.1	Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von <i>Escherichia coli</i> K12	87
7.1.2	Bedeutung der Befunde für den Acarbose-Metabolismus von <i>Actinoplanes</i> sp.	91
7.2	Charakterisierung des Maltose/Maltotriose-Transports bei <i>Actinoplanes</i> sp.	93
7.2.1	Die Transportaktivitäten von <i>Actinoplanes</i> sp.	93
7.2.2	Charakterisierung eines potentiellen Maltose-Bindeproteins	99
7.2.3	Modell der Kapazitäten für die Aufnahme von Maltose und Maltotriose durch <i>Actinoplanes</i> sp.	102
7.3	Charakterisierung des potentiellen Acarbose-ABC-Transporters AcbHFG-MsiK₂.....	104
7.3.1	Der potentielle Transportkomplex AcbFG-MsiK ₂	104
7.3.2	Das Substrat-Bindeprotein AcbH	105
7.3.3	Erweitertes Modell des Acarbose-Metabolismus von <i>Actinoplanes</i> sp.	109
8.	AUSBLICK.....	114

LITERATUR	115
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	126
TABELLENVERZEICHNIS	127
DANKSAGUNG	128
ANHANG	129
Peptidsequenzen des potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins	129
Lebenslauf.....	130
Selbständigkeitserklärung	131

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	engl.: ATP-binding cassette
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl.: bovine serum albumine
Cam	Chloramphenicol
cAMP	engl.: cyclic-AMP
CAP	engl.: Catabolite Activator Protein
CFTR	engl.: Cystic Fibrosis Conductance Regulator
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GC	Guanin, Cytosin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kB	kilo Basen DNA
kDa	kilo Dalton
K _m	Michaeliskonstante
LB	Luria-Bertani
Mal	Maltose
MBP	Maltosebindeprotein
NB	engl. : Nutrient Broth
OD	optische Dichte
orf	engl.: open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TNT	Tris-NaCl-Tween 20
Tsr	Thiostrepton
U	engl. : units
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
wt	Wildtyp

3. ZUSAMMENFASSUNG

Das Pseudotetrasaccharid Acarbose hat als Inhibitor gegenüber Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen medizinische Bedeutung bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ II erlangt. Das Acarbose-Biosynthese-Gencluster (*acb*) des grampositiven Produzenten *Actinoplanes* sp. wurde identifiziert und Genprodukte z. T. charakterisiert. Das abgeleitete Modell zum Acarbose-Metabolismus beschreibt einen extra- und intrazellulären Acarbosekreislauf, bei dem das Pseudotetrasaccharid analog den Eisen-Siderophoren als Carbophor fungiert. Dabei wird das Molekül im Zytoplasma synthetisiert, in das umgebende Medium abgegeben und durch das Zusammenwirken zweier extrazellulärer Enzyme nach Stärkehydrolyse mit einer unterschiedlichen Anzahl an Glukosemonomeren beladen. Nach dem vermuteten Re-Import über ein Bindeprotein-abhängiges ABC-Transportsystem stünde dem Organismus dann ein Gewinn an Glukosemolekülen zur Verfügung. Neben diesem Vorteil gegenüber Nahrungskonkurrenten im Habitat fungiert Acarbose ebenso als Hemmer der artfremden extrazellulären α -Amylasen. Über die Acarbose-vermittelte Ausbeute an Kohlenstoff- und Energiequelle hinaus sollte *Actinoplanes* sp. im Stärke-reichen Habitat auch über eine Kapazität zur Aufnahme von Maltose und Maltodextrinen verfügen.

Im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde die ökologische Funktion des Pseudotetrasaccharids verifiziert und ausgeweitet. Untersuchungen zum Einfluss auf den Maltodextrin-Stoffwechsel von *E. coli* haben gezeigt, dass Acarbose gleichsam Maltose effektiv durch das Maltose-Importsystem MalEFGK₂ als Substrat erkannt und in die Zellen importiert wird. Demgegenüber sind die maltolytischen Enzyme im Zytoplasma nicht in der Lage, diese Substanz als C-Quelle zu nutzen. Die intrazelluläre Akkumulation von Acarbose führt zum Absterben der Zellen.

Da eine alleinige Hemmwirkung des Pseudozuckers auf Exoenzyme der Nahrungskonkurrenten bisher keine befriedigende Erklärung für einen effizienten Wettbewerb um Kohlenstoffquellen lieferte, kann nunmehr von einem ausgedehnteren und ökonomisch sinnvolleren Konkurrenzverhalten von *Actinoplanes* sp. gesprochen werden. Von den im Verlauf der Aktivität der extrazellulären α -Amylase des Acarboseproduzenten selbst bereitgestellten Maltosacchariden aus Stärke profitieren artfremde Mikroorganismen nicht, da neben den Exoenzymen auch die Maltodextrin-Aufnahmesysteme in ihrer Funktion gehemmt sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine für *Actinoplanes* sp. geforderte Kapazität zur Aufnahme von Maltose und Maltodextrinen *in vivo* gefunden und in Transportexperimenten mit radioaktiv markierten Zuckern charakterisiert. Festgestellt werden konnte, dass die Transportaktivität wahrscheinlich über zwei Bindeprotein-abhängige ABC-Importer mit multiplem Substratspektrum realisiert wird. Während die Substratspezifitäten überlappend sind, ist nur eines der beiden Systeme durch Acarbose inhibierbar. Aus dem Kulturüberstand konnte nach Anzucht der Zellen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen ein potentiell, Acarbose-insensitives Maltodextrin-Bindeprotein isoliert werden.

Das innerhalb des Acarbose-Biosynthese-Genclusters kodierte Bindeprotein-abhängige ABC-Importsystem AcbHFG wurde zur Ermittlung der Funktion im Acarbose-Metabolismus heterolog in *E. coli* und *S. lividans* synthetisiert und z. T. erfolgreich gereinigt. Ein im *acb*-Cluster fehlendes Gen für ein den Transportkomplex möglicherweise vervollständigendes ABC-Protein wurde in DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten mit dem Gen des MsiK-Proteins aus *S. lividans* detektiert und kloniert. Ko-Elutionsexperimente weisen auf die Ausbildung eines AcbFG-MsiK-Komplexes hin. In Substrat-Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz konnte für das AcbH-Protein eine Interaktion mit Acarbose und längerkettigen Derivaten, nicht jedoch mit Maltose/Maltodextrinen beobachtet werden. Dieser Befund unterstützt die Hypothese zur Beteiligung des Komplexes am Re-Import des beladenen Carbophors.

4. EINLEITUNG

Der Sekundärmetabolit Acarbose (Pseudomaltotetraose) ist als Inhibitor von Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen, vornehmlich Maltasen und Saccharasen, bekannt geworden. Seit 1990 wird Acarbose unter dem Namen Glucobay[®] als Wirkstoff zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt. Das Biosynthese-Gencluster des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. ist identifiziert worden (STRATMANN, 1997). Man findet eine Reihe von Genen für die Biosynthese von Acarbose und für Komponenten eines ABC-Exportsystems. Daneben sind auch katabole Enzyme und ein ABC-Importsystem kodiert. Dieser für einen Sekundärstoffwechsel ungewöhnliche Befund führte zu der Vorstellung eines intra- und extrazellulären Acarbose-Kreislaufs, der einen hochentwickelten Stärke-Metabolismus darstellen könnte. Induktoren der Synthese einiger der Schlüsselenzyme des Acarbose-Metabolismus sind Maltose und Maltotriose. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren die Charakterisierung der Importkapazität von *Actinoplanes* sp. für Maltose, Maltotriose und Acarbose sowie die Ermittlung der Substratspezifität des ABC-Importsystems. Weiterhin wurden Untersuchungen zum Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von *Escherichia coli* K12 durchgeführt. Zur Darstellung des Forschungsthemas werden daher im Folgenden die bisherigen Kenntnisse zum Acarbose-Metabolismus und die Funktionsweise und Charakteristika von ABC-Transportern sowie der Maltose-Metabolismus von *E. coli* aufgeführt.

4.1 Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp.

Das grampositive Bakterium *Actinoplanes* sp. ist Mitglied der Gattung *Actinoplanes* und wie die Gattung *Streptomyces* in die Gruppe der Actinomyceten einzuordnen. *Actinoplanes*-Stämme besiedeln verschiedenste Habitate und konnten aus einer Vielzahl unterschiedlicher Böden, marinen Habitaten sowie Binnengewässern isoliert werden. Charakteristisch ist das filamentöse Wachstum, welches zur Ausbildung von Substratmycelien führt (PARENTI & CORONELLI, 1979; JENSEN ET AL., 1991). Eine Besonderheit liegt in der Unempfindlichkeit gegenüber der N-Acetylmuramidase Lysozym, da innerhalb der Peptidoglykanstruktur N-Acetylmuraminsäure durch N-Glykolylmuraminsäure substituiert ist (VOBIS, 1989). Actinomyceten zeichnen sich durch die Synthese diverser Sekundärmetabolite aus (z. B. Antibiotika wie Thiostrepton und Streptomycin; GRÄFE, 1992). Über die Suche nach

antimikrobiellen Substanzen hinaus wurde seit den 60iger Jahren in verschiedenen Screening-Verfahren das Auffinden weiterer Wirkstoffe für industrielle oder medizinische Anwendungen angetrieben. So wurde in der Kulturbrühe von *Actinoplanes* sp. SE50 der hitze- und säurestabile α -Glukosidase-Inhibitor Acarbose entdeckt (FROMMER *ET AL.*, 1975; TRUSCHEIT *ET AL.*, 1981). Verbesserte Abkömmlinge dieses Stammes werden heute industriell in Fermentationsverfahren durch die Bayer AG eingesetzt, zwei abgelegte Derivatstämme (SE50/110 und SN223/29) waren Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Acarbose (Abbildung 4.1) ist ein Pseudotetrasaccharid, analog zu Maltotetraose, und Komponente eines komplexen Gemisches kürzerer und längerer Homologe, die in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des angebotenen Stärkehydrolysats als Kohlenstoffquelle gebildet werden (SCHMIDT *ET AL.*, 1977). Kernstruktur ist das für die Hemmwirkung essentielle Pseudodisaccharid Acarviosin (HEIKER *ET AL.*, 1981), bestehend aus dem Valienamin und einer Amino-Dideoxyglukose, welches α -1,4-glykosidisch mit einer Maltose verknüpft ist. Für detailliertere Informationen zur Biosynthese von Acarbose wird auf die Beschreibung in WEHMEIER & PIEPERSBERG (2004) und darin zitierte Artikel verwiesen.

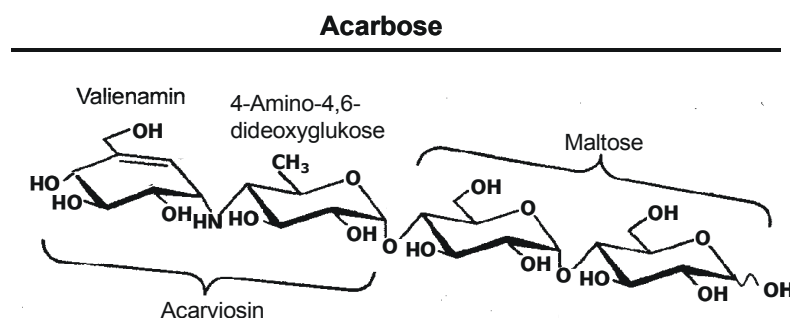


Abbildung 4.1: Struktur des Sekundärmetaboliten Acarbose. Bei dem Pseudotetrasaccharid ist ein Ringsystem keine Hexose, sondern ein ungesättigtes C₇-Cyclitol (Valienamin). Die glykosidische Bindung innerhalb der Acarviosineinheit wird über ein Stickstoffatom realisiert und ist durch α -Glukosidasen nicht spaltbar (HEIKER *ET AL.*, 1981).

Neben einer Reihe von Acarbose-Derivaten, die sich in der Anzahl der am reduzierenden oder nicht reduzierende Ende des Acarviosins verknüpften Glukoseeinheiten unterscheiden, produziert *Actinoplanes* sp. auch Komponenten mit Variationen des terminalen Zuckerrestes (Fruktose, Mannose) und der Art der terminalen glykosidischen Bindung (α -1,1-; s. auch Seite 77, Tabelle 6.2).

Das Biosynthese-Gencluster (STRATMANN, 1997; STRATMANN *ET AL.*, 1999) enthält wahrscheinlich 25 *acb*-Gene (**A**carbose-**B**iosynthese). Die Charakterisierung einiger der

Genprodukte führte zu dem **Modell eines intra- und extrazellulären Acarbose-Metabolismus**, in dem das Pseudotetrasaccharid analog den Eisen-Siderophoren eine Carbophor-Funktion übernimmt (Abbildung 4.2).

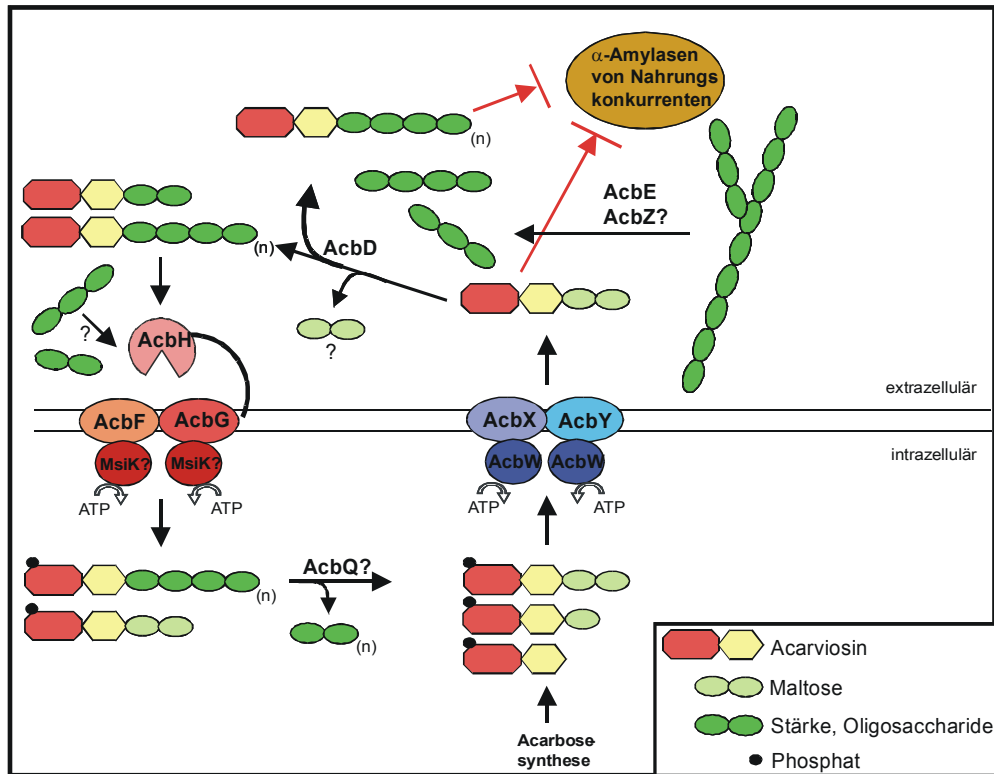


Abbildung 4.2: Modell des Acarbose-Metabolismus (verändert nach STRATMANN, 1997; WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004). Dargestellt ist ein aktuelles Modell, das bereits die erzielten Ergebnisse zweier im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigter Diplomarbeiten (SCHÄFER, 1999; ELVERS, 2002) berücksichtigt. Gezeigt ist der hypothetische Zyklus von Acarbose zwischen einem intra- und extrazellulären Stärke-Metabolismus. **AcbWXY**: ABC-Exporter, **AcbHFG-MsiK₂?**: ABC-Importer, **AcbQ**: Amylomaltase, **AcbD**: Acarviosyl-Transferase, **AcbZ**, **AcbE**: α -Amylasen. (n) kennzeichnet variable Anzahlen an Glukoseresten. Die Darstellung der in diesem Schema möglichen Funktion von AcbHFG-MsiK₂? als Maltose/Maltodextrin-Importer ist nicht Bestandteil des von STRATMANN (1997) und WEHMEIER & PIEPERSBERG (2004) aufgestellten Modells.

Das tatsächlich exportierte Endprodukt der Acarbose-Biosynthese ist bisher unbekannt. Während der Synthese bis zum Export, der vermutlich über das ABC-Transportsystem AcbWXY (s. auch Abschnitt 4.2.1) realisiert wird, bleibt die Position 7 des Valienamin phosphoryliert (WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004). Acarbose-7-Phosphat besitzt keine Enzymhemmende Wirkung, intrazellulär aktive Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen wie z. B. die vermutete Amylomaltase AcbQ bleiben geschützt (DREPPER & PAPE, 1996). Außerhalb der Zelle katalysiert die Acarviosyl-Transferase AcbD den Transfer des dephosphorylierten (Enzym unbekannt) Acarviosins auf Maltose oder Maltooligosaccharide (HEMKER *ET AL.*, 2001). Diese Acarviosyl-Akzeptoren werden durch die Aktivität der α -

Amylase AcbE aus Stärke bereitgestellt (STRATMANN, 1997). Die Besonderheit dieses Enzyms liegt darin, dass es unempfindlich gegenüber Acarbose ist. Eine zweite extrazelluläre α -Amylase AcbZ hingegen ist Acarbose-sensitiv (HEMKER, 1997) und möglicherweise ebenfalls an der Erschließung von Kohlenstoffquellen beteiligt. Acarbose und die verlängerten Derivate werden dem Modell entsprechend über ein ABC-Importsystem AcbHFG-MsiK₂? (s. auch Abschnitt 4.2.2) wieder aufgenommen und innerhalb der Zelle durch die Acarbose-7-Kinase rephosphoryliert (DREPPER & PAPE, 1996). Nach einer Deglukosylierung (AcbQ?) beginnt mit dem Export des entladenen Carbophors ein neuer Acarbose-Kreislauf. Das Resultat ist ein Nettogewinn an Kohlenstoff- und Energiequelle. In diesem Modell fungiert die Acarbose nicht nur als „Glukose-Falle“. Einen weiteren Vorteil verschafft sich *Actinoplanes* sp. auch durch die Hemmungswirkung des Pseudozuckers gegenüber α -Amylasen der Nahrungskonkurrenten im Habitat (WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004). Da Maltose und Maltotriose als Induktoren der Acarbose-Biosynthese fungieren, kann darüber hinaus eine Rolle des AcbHFG-MsiK₂?-Komplexes als Maltose/Maltodextrin-Transporter nicht ausgeschlossen werden.

4.2 ABC-Transportsysteme

Kohlenhydrat-Katabolismus von lebenden Zellen beginnt mit der Aufnahme von Zuckermolekülen über die Zellmembranen in das Zytoplasma. Die hydrophobe Natur der Zytoplasmamembran stellt eine Permeabilitätsgrenze für den unkontrollierten Stoffein- bzw. austritt polarer Substanzen dar. Der lebenswichtige Import von Nährstoffen wird daher durch spezielle Proteine realisiert, die in die Membranen eingelagerte Transportsysteme, auch Permeasen oder Carrier genannt, ausbilden und nach zwei prinzipiellen Mechanismen wirken. Die Carrier-vermittelte Diffusion durch Porine gramnegativer Bakterien (SCHULZ, 1996; s. auch Abschnitt 4.2.3.1) erlaubt lediglich passive Transportvorgänge bis hin zu einem Konzentrationsausgleich. Hingegen ermöglichen aktive Transportmechanismen unter Energieaufwand die Akkumulation einer Substanz im Zellinneren. Je nach Art der Energiequelle spricht man von primären oder sekundären Transportsystemen. Die Protonensymporter für Maltose von *Bacillus licheniformis* und Laktose von *Escherichia coli* sind z. B. durch ein elektrochemisches Potential über der Membran (sekundäre Energieform) angetrieben (TANGNEY ET AL., 1992; BROOKER, 1990). ABC-Transporter und das

Gruppentranslokationssystem PTS (**Phosphotransferase-System**; POSTMA *ET AL.*, 1996) sind an die Hydrolyse primärer Energieformen wie ATP und PEP (**Phosphoenolpyruvat**) gekoppelt.

ABC-Transportsysteme (ATP-binding cassette) finden sich in allen drei Organismenreichen. Sie funktionieren als Im- oder Exportsysteme und translozieren eine Substanz unter ATP-Verbrauch (HYDE *ET AL.*, 1990; HIGGINS, 1992; SAURIN *ET AL.*, 1999). Neben einer in Bezug auf die chemische Natur der Substanzen breit gefächerten Transportkapazität (Import von Nährstoffen wie Zucker, Aminosäuren, Peptide, Vitamine und Ionen und Export von Toxinen, Antibiotika und Virulenzfaktoren) nehmen ABC-Systeme an vielfältigen biologischen Prozessen wie Proteinsekretion, Signaltransduktion, Sporulation, Antibiotikaresistenz, bakterieller Pathogenität und Antigenpräsentation teil (HIGGINS, 1992). Einige Vertreter der ABC-Transporter haben aufgrund medizinischer Relevanz besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit erlangt. So verursacht ein Defekt im humanen CFTR-Protein die Erbkrankheit Mukoviszidose (COLLINS *ET AL.*, 1992), die MDR1- und MRP1-Proteine verursachen bei Überproduktion die Multiresistenz von Krebszellen (GOTTESMAN & PASTAN, 1993; GOTTESMAN & AMBUDKAT, 2001). Die Adrenoleukodystrophie und eine seltene Form des Diabetes sind weitere Krankheitsbilder mit Ursachen in defekten ABC-Transportern (MOSSER *ET AL.*, 1993; AGUILAR-BRYAN *ET AL.*, 1995).

4.2.1. Die strukturelle Organisation von ABC-Transportern

Die große Familie der ABC-Transportsysteme zeichnet sich durch eine gemeinsame Organisationsstruktur aus (Abbildung 4.3). Von vier distinkten Domänen sind zwei in die Membran integriert und bilden die Translokationspore für ein Substrat. Zwei weitere zytoplasmatische Proteinkomponenten sind peripher an den Membrankomplex assoziiert. Sie stellen die ABC-Domänen dar und energetisieren den Transportvorgang durch ATP-Hydrolyse.

Die erwähnten funktionellen Domänen der ABC-Transporter können als separate Proteine oder teilweise bis vollständig fusioniert vorliegen. Für eukaryotische Exporter ist eine einzige Polypeptidkette typisch. Während bei Eukaryoten nur Exportsysteme vorkommen, verfügen Prokaryoten auch über Importsysteme, die als Besonderheit eine zusätzliche extrazelluläre Domäne aufweisen (BOOS & LUCHT, 1996). Diese als Substrat-Bindeproteine bezeichneten Komponenten sind bei gramnegativen Bakterien frei im Periplasma lokalisiert, bei

grampositiven Bakterien und vermutlich einigen Archaea jedoch über eine Lipidmodifikation des Cysteins am N-Terminus extrazellulär in der Membran fixiert (SUTCLIFFE & RUSSELL, 1995; HORLACHER *ET AL.*, 1998). Bei anderen Archaea liegt es durch ein C- oder N-terminales, hydrophobes Transmembransegment an der Außenseite der Zytoplasmamembran gebunden vor (ELFERINK *ET AL.*, 2001; KONINGS *ET AL.*, 2002).

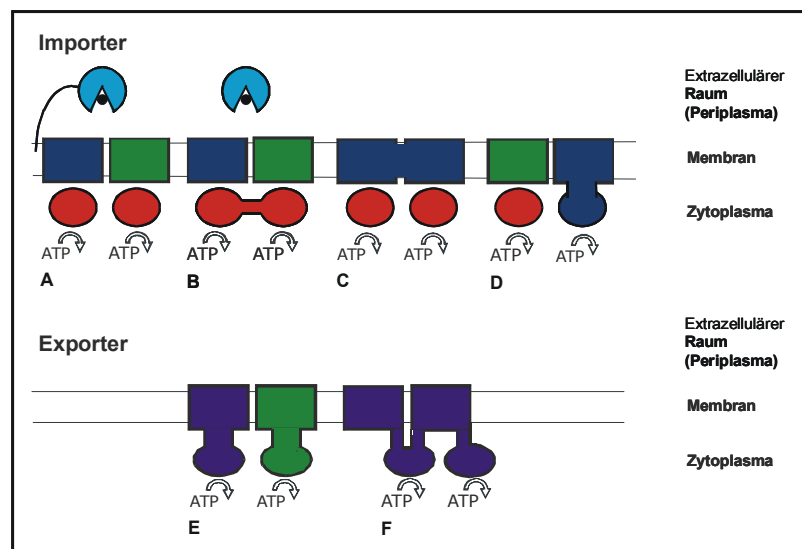


Abbildung 4.3: Struktureller Aufbau von ABC-Transportern (verändert nach SCHNEIDER, 2000). Schematisch dargestellt sind prokaryotische Bindeprotein-abhängige Importer (A bis D) sowie pro- und eukaryotische Exporter (E resp. F). Einzelne Domänen können separat (A), teilweise fusioniert (B, C, D, E) oder auf einer einzigen Polypeptidkette (F) vorliegen. Das für bakterielle Systeme typische, extrazelluläre bzw. periplasmatische Bindeprotein ist in (A und B) symbolisiert. Die Verbindungslinie zur Membran in (A) symbolisiert den Lipidanker der fixierten Bindeproteine bei grampositiven Bakterien.

Je nach Richtung des Transportes und Art des Substrates werden ABC-Transporter in 45 verschiedene Subfamilien eingeteilt, darunter 18 bisher beschriebene Familien von Aufnahmesystemen, von denen wiederum zwei spezifisch für den Import von Kohlenhydraten sind: Mitglieder der CUT1 (carbohydrate uptake transporter) transportieren verschiedene Di- und Oligosaccharide sowie Glycerin-Phosphat und Polyole, Substrate der CUT2 sind Monosaccharide (SAIER, 2000; DASSA & BOUIGE, 2001; SCHNEIDER, 2001).

4.2.2. Bindeprotein-abhängige ABC-Importer

Die extrazellulären **Substrat-Bindeproteine** stellen die primäre Erkennungsstelle dar und sind im wesentlichen für die Substratspezifität und die hohe Affinität des Transportsystems verantwortlich (K_D -Werte von 0,01 μM bis 10 μM ; TAM & SAIER, 1993). Während sich die

Primärstrukturen stark unterscheiden, legen Kristalle verschiedener Bindeproteine eine übereinstimmende Tertiärstruktur dar. Es handelt sich um monomere Proteine, reich an α -helikalen Strukturen, mit zwei getrennten, ähnlich gefalteten globulären Domänen, die über ein Scharnier aus β -Faltblättern miteinander verbunden sind. Zwischen den beiden Domänen erfolgt die Substratbindung, stabilisiert durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen (QUIOCHO & LEDVINA, 1996; QUIOCHO *ET AL.*, 1997). Nach Komplexierung des Substrats schließt sich der Spalt und nur dieses geschlossene, substratbeladene Bindeprotein kann durch Interaktion mit den Membrankomponenten den Transportvorgang initiieren (SHARFF *ET AL.*, 1992; OH *ET AL.*, 1993; BOHL *ET AL.*, 1995; SHILTON *ET AL.*, 1996; AMES *ET AL.*, 1996; HALL *ET AL.*, 1997a,b,c).

Zwei **membranintegrale Proteine** bilden als Homo- oder auch Heterodimer die Translokationspore. Die Mehrzahl dieser Transporterkomponenten besteht aus sechs transmembranen Helices, die über drei periplasmatische und zwei zytoplasmatische hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind. Die N- und C-Termini sind in das Zytoplasma gerichtet (BOOS & LUCHT, 1996). Bei einer insgesamt nur begrenzten Sequenzübereinstimmung aufgrund der breiten Diversität an Substraten findet man dennoch ein hoch konserviertes Motiv. Der sogenannte EAA-Loop (Konsensus-Sequenz EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP) ist innerhalb der letzten zytoplasmatischen Schleife lokalisiert und übernimmt als Kontaktstelle zu den ABC-Domänen eine wichtige Funktion im Transportmechanismus (MOUREZ *ET AL.* 1997; LOCHER *ET AL.*, 2002).

Die **ABC-Domänen** stellen die am stärksten konservierten Untereinheiten von ABC-Transportern dar. Sie sind als Homo- oder auch Heterodimer organisiert und auf der zytoplasmatischen Seite peripher an die Membrankomponenten assoziiert. Die Ähnlichkeit dieser ATP hydrolysierenden Proteine wird dadurch reflektiert, dass einige solcher Komponenten zwischen verschiedenen Transportern funktionell austauschbar sind. So können die Proteine MalK und UgpC der Transporter für Maltose und Glycerin-3-Phosphat von *E. coli* einander ersetzen (HEKSTRA & TOMMASSEN, 1993), MalK von *S. typhimurium* ist außerdem durch das Protein LacK des Laktosetransporters von *Agrobacterium radiobacter* vertretbar (WILKEN *ET AL.*, 1996). Bei grampositiven Bakterien ist es nicht ungewöhnlich, dass ein ABC-Protein mehrere Zucker-Transporter bedient (s. auch Abschnitt 4.2.3.2; SCHLÖSSER *ET AL.*, 1997; SCHLÖSSER, 1999).

Die charakteristischen konservierten Bereiche in ABC-Domänen sind die Nukleotidbindemotive „Walker sites“ A und B (WALKER *ET AL.*, 1982) sowie die sogenannte

Signatursequenz (Konsensus-Sequenz LSGGQ) unmittelbar vor Walker B. Sie wird zur Identifizierung neuer Mitglieder der Familie der bakteriellen Importer herangezogen und ist vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt (FETSCH & DAVIDSON, 2002). Für die Interaktion der ABC-Domänen mit den Membrankomponenten wird die zwischen den beiden Walker-Motiven gelegene hydrophobe, helikale Subdomäne verantwortlich gemacht (SCHNEIDER & HUNKE, 1998).

4.2.3. Maltose-Importsysteme von Prokaryoten

Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter für Maltose und Maltodextrine von Prokaryoten sind Mitglieder der CUT1-Subfamilie (SCHNEIDER, 2001). Neben einer gemeinsamen strukturellen Organisation (entspr. (A) in Abbildung 4.3) weisen die ABC-Domänen von Transportern der CUT1-Subfamilie als Besonderheit eine C-terminale Extension von ca. 120 bis 150 Aminosäuren auf, die essentiell für die Interaktion mit regulatorischen Proteinen ist (BOOS & SHUMAN, 1998). Innerhalb dieser Verlängerung existiert ein kurzes Sequenzmotiv (Konsensus-Sequenz GI/VRPED/H) mit bisher unbekannter Funktion, welches zur Identifizierung neuer Mitglieder der CUT1-Subfamilie herangezogen wird.

4.2.3.1. Maltose-Importsysteme von gramnegativen Bakterien

Als Modellsystem für den Bindeprotein-abhängigen Maltose- und Maltodextrin-Import der gramnegativen Bakterien sollen die bisher best untersuchten ABC-Transporter MalEFGK₂ von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* herangezogen werden (Abbildung 4.4; BOOS & SHUMAN, 1998; SCHNEIDER, 2003). Beide Transporter besitzen mehr als 90 % identische Aminosäuren, sind funktionell austauschbar und werden im Folgenden als ein System behandelt.

Da sich die Zellhülle über drei Schichten erstreckt, beginnt die Substrataufnahme zunächst mit einer Passage durch die Äußere Membran via einer **Maltoporin** vermittelten erleichterten Diffusion. Das Maltoporin ist ein Homotrimer des Proteins LamB (47 kDa) und wird für die Aufnahme von Maltose und insbesondere Maltodextrinen (bis zu Maltoheptaosen) bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ benötigt. Bei höheren Konzentrationen diffundieren die Oligosaccharide über die unspezifischen Porine OmpF und OmpC in das Periplasma.

Das periplasmatische **Bindeprotein MalE** (40 kDa) stellt die Substrat-Erkennungsstelle dar und komplexiert Maltose sowie Maltodextrine mit hoher Affinität ($K_D \sim 1\mu\text{M}$). Die Bindung

des Liganden führt zur Ausbildung einer stabilen, geschlossenen Konformation, die sich mit der substratfreien, offenen Form im Gleichgewicht befindet. Beide Formen interagieren mit den Membranproteinen, jedoch nur das beladene, geschlossene MalE kann die ATP-Hydrolyse an den ABC-Domänen und damit die Substrattranslokation bewirken.

Die **membranintegralen Proteine MalF** (57 kDa) und **MalG** (32 kDa) bestehen aus acht bzw. sechs transmembranen Segmenten. Aminosäureaustausche an verschiedenen Stellen, z. B. G338R zusammen mit N505I in den Transmembransegmenten 5 und 8 von MalF (*malF500*) weisen auf eine Beteiligung der Membranproteine an der Substraterkennung hin. Die erwähnten Mutationen führen zu einem Bindeprotein-unabhängigen Phänotyp, da resultierende Konformationsänderungen zu einer konstitutiven ATP-Hydrolyse führen, die Initiation durch den Substrat-MalE-Komplex nicht notwendig ist.

Das **ABC-Protein MalK** (40 kDa) ist als Homodimer aktiv und peripher an MalF und MalG assoziiert. MalK ist leicht überproduzier- und isolierbar. Während eine ATP-Hydrolyse im rekonstituierten Komplex MalFGK₂ von der Anwesenheit des substratbeladenen Bindeproteins MalE abhängig ist, besitzt das lösliche Protein MalK eine spontane ATPase-Aktivität ($K_M \sim 0,1 \text{ mM}$).

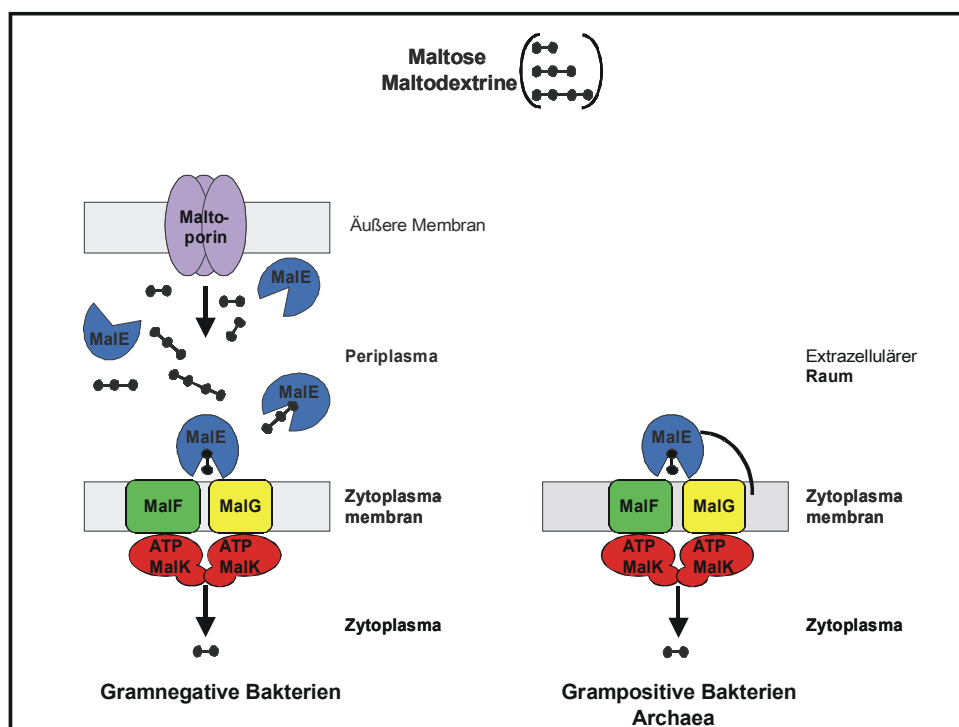


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Maltose-Importsysteme von Prokaryoten (verändert nach SCHNEIDER, 2003). Neben den aufgeführten Maltooligosacchariden stellen auch höhere Homologe mit bis zu sieben Glukoseeinheiten Substrate dar. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Im **Katabolismus** werden die im Zytoplasma ankommenden Maltose und Maltodextrine zu Glukose und Glukose-1-Phosphat degradiert. Dies geschieht durch die gemeinsamen Aktivitäten der Amylomaltase MalQ, der Maltodextrin-Phosphorylase MalP und der Maltodextrin-Glukosidase MalZ. Da Maltodextrine > Hexaosen nur schlecht durch das MalEFGK₂-System importiert werden, sorgt eine periplasmatische Amylase MalS für deren Verkürzung. **MalQ** transferiert Maltosyl- oder längere Dextrinylreste auf das nicht reduzierende Ende von Glukose, Maltose und längere Maltodextrine, dabei wird jeweils ein Glukosemolekül entlassen. Die kleinste erkannte Einheit ist eine Maltotriose. **MalP** bildet Glukose-1-Phosphat durch sequenzielle Phosphorolyse vom nicht reduzierenden Ende von Maltopentaose und längeren Maltodextrinen. **MalZ** hydrolysiert vom reduzierenden Ende Maltoheptaose bis Maltotriose konsekutiv zu vornehmlich Glukose und auch Maltose (s. auch Seite 89, Abbildung 7.1).

4.2.3.2. Maltose-Importsysteme von grampositiven Bakterien und Archaeen

Im Vergleich zu den Systemen der Enterobakterien sind Transporter von grampositiven Organismen bisher nur wenig charakterisiert. Oft wurden über die Beobachtung extrazellulärer Enzymaktivitäten wie z. B. durch Amylasen (SCHWERMANN *ET AL.*, 1994) oder Cellulasen (WACHINGER *ET AL.*, 1989) in weitergehenden Untersuchungen die zugehörigen Gene eines Transportsystems identifiziert und aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit enterobakteriellen Komplexen den ABC-Importsystemen zugeordnet (HERRMANN *ET AL.*, 1996; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000; SCHLÖSSER & SCHREMPF, 1996; SCHLÖSSER *ET AL.*, 1997). Bindeprotein-abhängige ABC-Transportsysteme grampositiver Bakterien und Archaea weisen prinzipiell die gleiche Zentralstruktur wie die Verwandten der gramnegativen Organismen auf (Abbildung 4.4). Offensichtliche Unterschiede liegen zunächst in einer nicht notwendigen Beteiligung eines Porins. Außerdem erfolgt eine Fixierung des Substrat-Bindeproteins in der Zytoplasmamembran über eine kovalente Lipidmodifikation des N-terminalen Cysteins der reifen Form (SUTCLIFFE & RUSSELL, 1995), die das Lipoprotein anstelle eines periplasmatischen Raumes in physischer Nähe zu dem Transportkomplex hält. Des weiteren gibt es Variationen in der genetischen Organisation der Transportkomponenten. Während bei gramnegativen Bakterien die Gene für die Transportproteine gruppiert in Operonstrukturen vorliegen, fehlt den entsprechenden Operons grampositiver Bakterien und Archaea oftmals ein Gen für das ABC-Protein (GRELLER *ET AL.*, 1999; SCHLÖSSER *ET AL.*, 1999; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000).

Aufgrund der Verwandtschaft von *Actinoplanes* sp. zu den Streptomyceten sollen hier im weiteren die Maltose-Importer von *S. lividans*, *S. reticuli* und *S. coelicolor* kurz beschrieben werden (VAN WEZEL *ET AL.*, 1997a, b; SCHLÖSSER *ET AL.*, 1997, 2001). In allen drei Organismen wurden Maltose- und Maltotriose-Transport nachgewiesen und die zugehörigen *malEFG*-Operone z. T. identifiziert und charakterisiert. In *S. lividans* und *S. reticuli* wurde Cellobiose-Transportaktivität, in *S. reticuli* darüber hinaus auch Trehalose-Transportaktivität nachgewiesen. Das *ceb*-Operon von *S. reticuli* ist identifiziert und enthält ebenfalls kein Gen für ein ABC-Protein (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1999). Bei beiden Organismen assistiert das ABC-Protein MsiK (**m**ultiple **s**ugar **i**mport) jeweils den zwei bzw. drei erwähnten Transportsystemen mit unterschiedlicher Substratspezifität und unterliegt vermutlich einer getrennten Regulation. MsiK hat starke Ähnlichkeit zu MsmK aus *Streptococcus mutans* (RUSSELL *ET AL.*, 1992; HURTUBISE *ET AL.*, 1995), diese ABC-Domäne komplettiert nur das Msm-Transportsystem (**m**ultiple **s**ugar **m**etabolism), welches für die Aufnahme von Raffinose, Melibiose und Isomaltotriose spezifisch ist. Bei grampositiven Bakterien und Archaea scheint entweder die Rekrutierung eines ABC-Proteins für mehrere Transporter oder aber die Erfassung mehrerer Substratspezifitäten durch ein System ein Prinzip zu sein.

Auch im Acarbose-Biosynthesegencluster von *Actinoplanes* sp. wurde kein Gen einer ATP-hydrolysierenden Transporter-Untereinheit für das **ABC-Importsystem AcbHFG** gefunden (STRATMANN, 1997; WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004). Die Gene des putativen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporters mit dem höchsten Grad an Ähnlichkeit zum MsmEFGK₂-Importer von *S. mutans* sind in einem Operon organisiert. *acbH* repräsentiert ein extrazelluläres Substrat-Bindelipoprotein AcbH (47,3 kDa), *acbFG* kodiert die beiden Membranproteine AcbF (36,3 kDa) und AcbG (29,1 kDa). Wie auch die *msm*-Gene sind die Gene *acbHFG* vermutlich translational gekoppelt. Für AcbF wurden fünf bis sechs, für AcbG fünf Transmembransegmente vorhergesagt. Das Protein AcbH besitzt eine für extrazelluläre Lipoproteine typische Signalsequenz (FEKKES & DRIESSEN, 1999; TJALSMA *ET AL.*, 2000). Zusammen mit dem Sequenzmotiv innerhalb des verlängerten C-Terminus der ABC-Proteine (s. 4.2.3) wird ein N-terminaler Sequenzbereich von Bindeproteinen herangezogen, um eine Zuordnung zu Transporter-Familien zu leisten (TAM & SAIER, 1993; SCHNEIDER, 2003). In Abbildung 4.5 ist gezeigt, dass das Protein AcbH ein neues Mitglied der CUT1-Familie sein könnte. Neben einigen anderen der Signatursequenz entsprechenden Aminosäuren enthält AcbH auch das invariante Lysin.

Signatursequenz	L	X	X	L	G	K	X	F	E	X	D	X	X	G	I	K	V	X	V
für Bindeproteine	I				I	A	D		Y	T				E		N	V	I	L
der CUT1-Familie	V			V	I	Q				N		A				D	Y		P
	A			W	V												P		
AcbH <i>Asp.</i> (47)	P	I	T	F	G	S	N	Y	S		D	E		A	P	K	A	A	F
CebE <i>Sr</i> (68)	L	Y	D	E	Y	M	R	L	H	K	D	I		N	I	K	E	N	V
MalE <i>Sc</i> (55)	L	V	K	E	F	E	A	A	N	K				G	V	K	V	N	F
MalE <i>Ec</i> (46)	L	A	E	V	G	K	K	F	E	K	D	T		G	I	K	V	T	V
MsmE <i>Sm</i> (51)	L	K	K	I	I	K	D	F	E	R	E			N	P	K	I	H	V

Abbildung 4.5: Alignment der Signatursequenzen von Bindeproteinen. Die Zahlen geben die Position der jeweils ersten Aminosäure des Motivs an. Das hoch konservierte Lysin (K) ist rot hervorgehoben, weitere konservierte Reste sind grün markiert. *Asp.*: *Actinoplanes* sp., **CebE** *Sr*: Cellobiose-Bindeprotein aus *S. reticuli*, **MalE** *Sc*: Maltose-Bindeprotein aus *S. coelicolor*, **MalE** *Ec*: Maltose-Bindeprotein aus *E. coli*, **MsmE** *Sm*: multiple-sugar-metabolism-Bindeprotein aus *S. mutans*.

4.2.4. Globale Regulationsmechanismen für Kohlenstoffquellen bei gramnegativen und grampositiven Bakterien

Sind Bakterien einer Komposition verschiedener Kohlenstoffquellen ausgesetzt, ermöglichen Anpassungsmechanismen die Präferenz des für das Wachstum profitabelsten Substrates. Diese Mechanismen sind vor allem in *E. coli* und *B. subtilis* gut untersucht und werden unter dem Begriff Karbon-Katabolit-Repression (CCR, carbon catabolite repression) zusammengefasst (STÜLKE & HILLEN, 1999; TITGEMEYER & HILLEN, 2002). CCR involviert hier Komponenten des Glukose-spezifischen PTS (Phosphotransferase-System; POSTMA *ET AL.*, 1996; SAIER *ET AL.*, 1996; HUECK & HILLEN, 1995) und basiert hauptsächlich auf einer globalen Transkriptionskontrolle und dem Prinzip des Induktorausschlusses.

Bei **Enterobakterien wie *E. coli*** übernimmt die zentrale Rolle innerhalb der CCR das Enzym EIIA^{Glk} des PTS, welches über den Phosphorylierungsstatus den physiologischen Zustand der Zelle signalisiert. Bei Abwesenheit von Glukose stimuliert EIIA^{Glk}~P die Adenylat-Cyclase, resultierendes cAMP aktiviert zusammen mit dem CAP (catabolite activator protein) die Transkription Katabolit-kontrollierter Gene wie z. B. *mal* oder *lac*. Bei Anwesenheit von Glukose vermittelt dephosphoryliertes EIIA^{Glk} den Mechanismus des Induktorausschlusses durch allosterische Hemmung zytoplasmatischer Enzyme wie die Glycerin-Kinase oder von Transportsystemen. Im Falle des MalEFGK₂-Transportsystems geschieht dies über eine Bindung des EIIA^{Glk} an die regulatorische Domäne im C-Terminus von MalK. Damit ist die den Transportvorgang energetisierende ATP-Hydrolyse gestört und die Induktoren des Systems können nicht mehr importiert werden (DEAN *ET AL.*, 1990; LANDMESSER *ET AL.*,

2002). Die Initiation der Transkription des Maltoseregulons durch den cAMP-CAP-Komplex erfolgt z. T. synergistisch mit dem positiven Regulatorprotein MalT. Nach Aktivierung von MalT durch den Induktor Maltotriose ist das Regulatorprotein nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von cAMP-CAP in der Lage, an die MalT-Boxen aufwärts der Promotoren der Gene des Transport-Komplexes effektiv zu binden (BOOS & SHUMAN, 1998; BOOS & BÖHM, 2000).

Bei **grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wie *B. subtilis*** reflektiert der Phosphorylierungsstatus des Proteins HPr des PTS die Nährstoffsituation in der Zelle. HPr wird deshalb als funktionelles Äquivalent des EIIA^{Glc} der Enterobakterien betrachtet. Bei Anwesenheit von Glukose stimuliert das glykolytische Intermediat Fruktose-1,6-Bisphosphat das Enzym HPr-Kinase, welches HPr an einer ausschließlich regulatorischen Position, nämlich Serin 46, phosphoryliert. HPr-S46~P interagiert als Ko-Repressor mit dem Regulatorprotein CcpA (catabolite control protein A), der resultierende Komplex kontrolliert die Transkription durch Bindung an die *cre*-Sequenzen (catabolite responsive element) Katabolit-kontrollierter Gene wie z. B. die der Amylase oder der Phosphofruktokinase. In Abhängigkeit von der Lokalisation der *cre*-Box wird die Transkription inhibiert (*cre* innerhalb der Promotorsequenz oder der kodierenden Region) oder aktiviert (*cre* aufwärts des Promotors).

Vergleichsweise wenig ist bekannt zu den Mechanismen der CCR bei **grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt wie *Streptomyces***. Katabolitrepression durch Glukose und andere Zucker ist bekannt, ein Transportsystem für das Monosaccharid ist bisher nicht identifiziert worden. BERTRAM *ET AL.* (2004) halten einen Protonensymporter für möglich. In *S. lividans* und *S. coelicolor* konnten funktionelle Fruktose-PTS nachgewiesen werden, eine Beteiligung des HPr in CCR wird nicht vermutet, Hinweise auf eine HPr-Kinase fehlen (TITGEMEYER *ET AL.*, 1995). Bei diesen Organismen ist der Maltooligosaccharid-Transport nach Kultivierung der Zellen in Maltotriose- und Glukosehaltigem Medium nicht reprimiert und bei Wachstum mit Glukose nicht induziert (SCHLÖSSER *ET AL.*, 2001).

Bisherige Befunde zur Regulation der *acb*-Gene in ***Actinoplanes* sp.** (STRATMANN, 1997) schließen Glukose als Katabolit-Repressor aus. Für die extrazellulären Enzyme AcbE und AcbD ist eine Induktion durch Maltose bzw. insbesondere Maltotriose nachgewiesen worden. Ein Gen für ein potentiell Regulatorprotein konnte mittlerweile identifiziert werden (U. Wehmeier, pers. Mitteilung).

4.3. Zielstellung der Arbeit

Die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erfolgte mit dem Ziel, einige der von STRATMANN (1997) formulierten Aspekte des Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp. zu überprüfen.

Eine erste Aufgabe war es, in Untersuchungen mit ganzen Zellen und Zellextrakten von *E. coli* einen Einfluss von Acarbose als Inhibitor von Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen und als Strukturanalogen von Maltotetraose auf den Maltose- und Maltodextrin-Stoffwechsel des gramnegativen Bakteriums zu überprüfen. Die erzielten Befunde sollten einen Rückschluss auf die vermutete Funktion der Acarbose bei der Erschließung von Kohlenstoffquellen in Stärke- und Maltodextrinhaltigen Habitaten zulassen. Die bisher diskutierte Rolle des Pseudotetrasaccharids als Hemmstoff der Exoenzyme von Nahrungskonkurrenten vernachlässigte die durch die α -Amylase von *Actinoplanes* sp. selbst bereitgestellten Hydrolyseprodukte, die dadurch auch für die artfremden Mikroorganismen zugänglich waren. Diese Art des Konkurrenzverhaltens allein konnte keine ökologisch sinnvolle Strategie im Nahrungswettbewerb beschreiben.

Weiterhin sollte in *Actinoplanes* sp. nach Aufnahmekapazitäten für Maltose und Maltodextrine, die Induktoren des Acarbose-Metabolismus, gesucht werden. Neben einer indirekten Aufnahme von Maltooligosacchariden über ein beladenes Acarbosemolekül (Carbophor) sollte es für die Zellen möglich sein, während des Wachstums mit Stärke auch den direkten Import zu leisten. Diese Untersuchungen sollten mit ganzen Zellen und radioaktiv markierten Substraten unternommen werden.

In einem dritten Teil dieser Arbeit galt das Interesse der Aufklärung der Funktion des im Acarbose-Biosynthese-Genclusters kodierten Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportsystems AcbHFG, für das eine Beteiligung am Import von Acarbose und längerkettigen Homologen im Rahmen des Kreislauf-Modells postuliert wurde. Die einzelnen Transporterkomponenten sollten heterolog in *E. coli* und *S. lividans* synthetisiert und anschließend gereinigt werden, um die Voraussetzungen für eine Rekonstitution des Systems in der definierten Umgebung von Proteoliposomen zu schaffen. Dafür sollte ein assistierendes ABC-Protein identifiziert werden. In Zucker-Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz und immobilisiertem Substrat-Bindeprotein AcbH sollte das Substratspektrum des betrachteten Systems ermittelt werden.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Chemikalien, Enzyme, Isotope und Materialien

Sämtliche Basischemikalien, Lösungsmittel, Detergenzien, Puffersubstanzen sowie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Antibiotika wurden von den Firmen ROTH (Karlsruhe), VWR (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Riedel de Haen (Seelze), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Biomol (Hamburg), DIFCO (Detroit, USA) und OXOID (Wesel) bezogen. Die Acarbose sowie das Maltooligosaccharid-Gemisch MD50 wurden freundlicherweise von der Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt.

Die Radiochemikalien [U-¹⁴C]-Maltose, [U-¹⁴C]-Maltotriose sowie Methyl- α -D-[U-¹⁴C]-glukopyranosid und die Szintillationsflüssigkeit wurden von den Firmen ICN (Eschwege), ARC-Biotrend (Köln) und Amersham Pharmacia Biotech (England) bezogen. Die ¹⁴C-Acarbose wurde freundlicherweise von der Bayer AG Wuppertal (Dr. Brehmer) zur Verfügung gestellt.

Als Säulenmaterialien zur Reinigung von Proteinen dienten zur Ionenaustauschchromatographie DEAE-Sepharose-Matrix von Amersham Pharmacia Biotech (Schweden) und zur Affinitätschromatographie die Nickel-NTA-Agarose von Qiagen (Hilden) sowie die Amylose-Matrix von New England Biolabs (Schwalbach). Des Weiteren wurden phosphorylierte Zucker mit Hilfe des Ionenaustauschmaterials Dowex 1 \times 2 (50 – 100 mesh, Cl⁻-Form) der Firma Fluka Chemie (Schweiz) aus Lösungen separiert. Die PD10-Säulen von Amersham Pharmacia Biotech wurden herangezogen, um per Gelfiltration verschiedene Lösungen umzupuffern. Das Kit zur Fusionierung von Proteinen mit einem Strep-Tag und deren Reinigung stammte von der IBA-GmbH (Göttingen).

Zur Bestimmung von Proteingehalten wurde das „BCA-Protein-Assay-Kit“ der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet.

Die DNA-Polymerase (Platinum[®]-Pfx), Oligonukleotide (z. T. DIG-markiert) und die Kb-DNA-Leiter wurden von den Firmen Invitrogen (Eggenstein) und MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Nukleotide, Restriktionsendonukleasen und die T4-Ligase stammten ebenfalls von Invitrogen sowie auch von New England Biolabs (Schwalbach) und Promega (Madison, USA). Die alkalische Phosphatase (aus Shrimps) wurde von Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das CONCERT[™] Rapid Gel Extraction System von Life Technologies (Eggenstein) benutzt, die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem CONCERT[™] High Purity Plasmid Miniprep System durchgeführt. Zur ortsspezifischen Mutagenese wurde das „Quik[®]Change Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Die Herstellung weiterer DIG-markierter Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nonradioactive“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim).

Für die Southern Blots wurde die Nylontransfermembran Hybond-N⁺, Porenweite 0,45 μ m, von Amersham-Buchler benutzt, in Western Blots wurden Nitrocellulosemembranen, Porenweite 0,45 μ m, und Filterpapiere von Schleicher & Schuell (Dassel) verwendet. Ebenso von Schleicher & Schuell bezogen wurden Membranfilter für die Transportmessungen (OE67) und die Substrat-Bindungsstudien (NC45) sowie auch Filtriereinheiten (FP 30/0, PV 050/3) zur Sterilisation von Nährlösungen.

Zum Einengen von Suspensionen wurde eine Amicon-Rührzelle zusammen mit YM10-Filtern (Ausschlussgröße 10 kDa) von Millipore (Bedford, USA) verwendet.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden folgende Antiseren eingesetzt:

Anti-MalE (Laborsammlung), Anti-AcbH und Anti-MsiK (polyklonal, Laborsammlung, Immunisierung von Kaninchen durch die Firma Pineda-Antikörper-Service) und monoklonale Anti-RGS, Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden), Anti-(His)₁₀ (Stratagene) und Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-IgG (Amersham Biosciences, England). Die Immunodetektion erfolgte durch Verwendung des „Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus System“ (NEN, Boston, USA), die Chemilumineszenz wurde mittels Hyperfilm (Amersham-Buchler, Braunschweig) bzw. im Lumi-Imager (Roche) nachgewiesen.

Der Nachweis DIG-markierter DNA-Sonden wurde mit Alkalische-Phosphatase gekoppelten Anti-DIG-Fabfragmenten und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD geführt (Roche Diagnostics Mannheim). Die Chemilumineszenz wurde ebenfalls mittels Hyperfilm (Amersham-Buchler, Braunschweig) nachgewiesen.

5.2 Bakterienstämme

Die Tabelle 5.1 umfasst die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Tabelle 5.1: Liste der Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp/Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BB4564	MC4100 <i>groEL140 zjd::Tn10 zje::ΩSpc^r/Str^r</i>	MOGK <i>ET AL.</i> , 1999
BB4565	MC4100 <i>groEL44 zjd::Tn10 zje::kan</i>	MOGK <i>ET AL.</i> , 1999
BL21(DE3)	F ⁻ <i>lon ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal (λcIts857 ind1 S am7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	STUDIER & MOFFAT, 1986
BL21-CodonPlus-RP	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU proL Cam^r]</i>	Stratagene (Amsterdam, NL)
C41 (DE3)	Derivat von BL21 (DE3)	MIROUX & WALKER, 1996
C43 (DE3)	Derivat von C41 (DE3)	MIROUX & WALKER, 1996
CB39	MC4100 <i>malQ::Tn10</i>	DECKER <i>ET AL.</i> , 1993
HS3018	MC4100 <i>malT^c-1 ΔmalE444</i>	EHRMANN & BOOS, 1987
JM109	e14 ⁻ (<i>mcrA</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96 supE44 hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	YANISCH-PERRON <i>ET AL.</i> , 1985
K12	Wildtyp	DSM 498
LMG194	F ⁻ <i>Δ lacX74 gal E thi rpsL Δ phoA (PvuII) Δ ara714 leu::Tn10</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
TK38	MC4100 <i>malZ Spec^r</i>	W. Boos über M. Ehrmann
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Actinoplanes</i> sp.		
SE 50/110	Acarbose-Produzent, WT	ATCC 31044
SN 223/29	Acarbose-Produzent	Bayer AG, Wuppertal
<i>Streptomyces lividans</i>		
TK23	Actinorhodin, <i>spc-1</i>	W. Piepersberg über M. Jarling

5.3 Medien

5.3.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Vollmedien

LB-Medium setzte sich aus 1 % Bacto Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl zusammen und wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Platten enthielten zusätzlich 1,5 % Agar-Agar (MILLER, 1972). **2 x LB-Medium** bestand aus 2 % Bacto Trypton, 2 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl und wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt (DEAN *ET AL.*, 1992). **2YT-Medium** enthielt 2 % Bacto Trypton, 2 % Hefeextrakt und 1 % NaCl und wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt (SAMBROOK *ET AL.*, 1989). **NB-Medium** bestand aus 0,8 % DIFCO-Bacto-Nutrient-Broth und 0,5 % NaCl (ROTH, 1970). **TPi-Medium** setzte sich aus 2 % Bacto Trypton, 1,5 % Hefeextrakt, 0,8 % NaCl, 0,2 % Na₂HPO₄ und 0,1 % KH₂PO₄ zusammen (MOORE *ET AL.*, 1993). **SOB-Medium** bestand aus 2 % Bacto Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl und 2,5 mM KCl und wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Zur Herstellung des **SOC-Mediums** wurde SOB-Medium zusätzlich mit 10 mM MgCl₂ und 20 mM Glukose versetzt (HANAHAH, 1983).

Minimalmedium

M63-Medium (MILLER, 1972) bestand aus 0,19 g MgSO₄ x 6 H₂O, 13,6 g KH₂PO₄ und 2 g (NH₄)₂SO₄ ad 1 l A. dest. Mit KOH wurde der pH auf 7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 80 µl einer sterilen 0,5 %igen FeSO₄-Lösung zugegeben. Als **Kohlenstoff-Quellen** wurden Maltose, Glukose oder Glycerin zu je 0,5 % angeboten.

Medienzusätze bzw. Antibiotika und Supplemente

Den Medien wurden bei Bedarf zur Selektion auf Plasmide die entsprechenden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 20 µg/ml (in 70 % Ethanol), Kanamycin 50 µg/ml.

5.3.2. Kultivierung von *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces lividans*

Vollmedium

TSB-Medium enthielt 30 % Trypton Soja Broth (Oxoid) (HOPWOOD *ET AL.*, 1985). **NB-S-Medium** setzte sich zusammen aus 1 % Glukose, 0,4 % Pepton aus Casein, 0,05 % MgSO₄, 0,2 % KH₂PO₄, 0,4 % K₂HPO₄ und 0,4 % Hefeextrakt. **SMA-Platten** bestanden aus je 20 % Mannit, Sojamehl (entfettet) und Agar (DISTLER *ET AL.*, 1985). **SPMR-Platten** enthielten 10,3 % Saccharose, 1 % MgCl₂, 0,5 % Hefeextrakt (DIFCO), 5 % Glukose, 20 ml 1 M TES-Puffer (pH 7,6), 2 ml Spurenelemente-Lösung (s. unter Minimalmedium) und 2,2 % Agar (DIFCO). Nach dem Autoklavieren wurden 2 ml einer 5 M CaCl₂-Lösung dazugegeben (BABCOCK & KENDRICK, 1988).

Minimalmedium

MNS-Medium (Minimalmedium nach NEUMANN mit Spurenelementen) bestand aus 5,7 g Tris-HCl, 1 g NaCl, 2 g (NH₄)₂SO₄, 0,5 g K₂SO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g CaCl₂, 0,34 g KH₂PO₄ ad 1 l A. dest. Mit einer 20 %igen H₂SO₄-Lösung wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml einer sterilen Spurenelemente-Lösung (HOPWOOD, 1985) hinzugegeben. Diese **Spurenelemente-Lösung** setzte sich wie folgt zusammen: 40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₃ x 6 H₂O, 10 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 10 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 10 mg Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O ad 1 l A. dest. Als **Kohlenstoff-Quellen** wurden Acarbose, Glycerin, Glukose, Maltose, Maltodextrine (Maltotriose bis Maltohexaose), MD50 (Stärkehydrolysat, enthält Maltose und Maltotriose), Laktose, Trehalose, Saccharose so wie Haferspелzen- und Birkenholzxylyan zu je 0,5 % und im Falle von MD50 auch zu 7 % angeboten.

Acarbose-Produktionsmedium

Das Acarbose-Produktionsmedium (STRATMANN, 1997) setzte sich aus drei verschiedenen Lösungen zusammen, die getrennt voneinander angesetzt und anschließend zusammengegeben und sterilfiltriert wurden. Lösung 1 bestand aus 70 g MD50, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 2 g Hefeextrakt ad 400 ml A. dest. Die Lösung 2 enthielt 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 und 5 g Tri-Natrium-Citrat ad 400 ml A. dest. Lösung 3 bestand aus 1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ und 2 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 200 ml A. dest.

Medienzusätze bzw. Antibiotika

Zur Selektion auf Plasmide wurde Thiostrepton in einer Endkonzentration von 25 µg/ml Medium (Stock 25 mg/ml DMSO, mit Wasser verdünnen) zugegeben.

5.4 Lagerung und Anzucht der Stämme

5.4.1 Stammhaltung

Escherichia coli: Zum Anlegen von Dauerkulturen der verschiedenen Stämme und Transformanten wurden 800 µl einer frischen, in NB-Medium gezogenen, ü.N.-Kultur mit 70 µl DMSO in einem Wheaton-Röhrchen (Zinsser, Frankfurt/Main) vermischt und bei – 80°C gelagert.

Actinoplanes sp.: Die beiden Stämme von *Actinoplanes sp.* wurden zur dauerhaften Lagerung zunächst für drei Tage in 5 ml TSB-Medium gezogen. 500 µl dieser Kulturen wurden schließlich mit 400 µl 87 %igem Glycerin in einem Wheaton-Röhrchen vermischt und ebenfalls bei – 80°C gelagert.

Streptomyces lividans: Zellen von *Streptomyces lividans* wurden als Sporensuspension dauerhaft bei – 20°C gelagert. Zur Herstellung solcher Sporensuspensionen wurden Einzelkolonien auf SMA-Platten ausgestrichen und für vier bis sechs Tage bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit entwickelten sich die Sporen, die dann mit 5 ml 20 % Glycerin überschwemmt und mit der Impföse abgestrichen wurden. Um enthaltene Agarreste zu entfernen, wurde die Suspension schließlich durch Haushaltswatte (gestopft in eine Einwegspritze und autoklaviert) filtriert.

5.4.2 Anzucht und Wachstumsbedingungen

Escherichia coli: Für die Anzucht der verschiedenen Stämme und Transformanten wurden vorab Ausstriche von Dauerkulturen bzw. Reinigungsausstriche von Transformationsansätzen auf LB-Platten angefertigt. Von diesen Platten, die als Stammpplatten für einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden konnten, erfolgte zunächst die Inokulation von 2 – 5 ml Flüssigmedium im Glasröhrchen zur Vorkultivierung der Zellen bei 37°C über Nacht. Für die Überexpression plasmidkodierter Gene, die Transportversuche sowie die Herstellung von Zellextrakten wurden schließlich verschiedene Flüssigmedien in einem Volumenverhältnis von 1:100 aus den Vorkulturen angeimpft. Die Anzuchten solcher Hauptkulturen (25 – 500 ml) erfolgten in der Regel bei Temperaturen von 30°C oder 37°C und stets in Schikanekolben so wie unter guter Belüftung (220 rpm, Modell G25, New Brunswick Scientific, Nürtingen). Das Wachstum wurde durch Messung der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 650 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia) verfolgt.

Actinoplanes sp.: Die Kultivierung der beiden Stämme erfolgte zunächst durch Anzuchten von Vorkulturen. Dazu wurden 5 ml TSB-Medium im Glasröhrchen mit 400 µl Dauerkultur beimpft. Nach drei Tagen wurden die Hauptkulturen für die Ermittlung von Transportraten und Proteinmustern angelegt. Dafür wurden entweder Minimalmedium MNS oder Vollmedium TSB bzw. Acarbose-Produktionsmedium (je 100 ml in 1 l Schikanekolben) in einem Volumenverhältnis 1:100 aus den Vorkulturen angeimpft. Für die Präparation chromosomaler DNA erfolgte die Kultivierung in 30 ml NB-S-Medium im 250 ml Schikanekolben. Die Anzucht solcher Hauptkulturen erfolgte stets bei einer Temperatur von 30°C so wie unter guter Belüftung (280 rpm,

Modell G25, New Brunswick Scientific, Nürtingen). Das Wachstum wurde durch Bestimmung des Proteingehaltes der Kultur (s. 5.7.3) verfolgt.

Streptomyces lividans: Die Anzucht erfolgte so wie bei *Actinoplanes* sp. unter guter Belüftung und stets bei 30°C. Zur Kultivierung wurden 5 ml TSB-Medium im Glasröhrchen mit 75 µl Sporensuspension inokuliert. Diese Vorkultur wurde drei Tage bebrütet, um damit in einem Volumenverhältnis von 1:50 die Hauptkulturen (50 ml in 250 ml Schikanekolben) für die Herstellung von Protoplasten, die Expressionsversuche und die Präparation chromosomaler DNA anzuimpfen.

5.5 Plasmide und Oligonukleotide

Die Tabellen 5.2 und 5.3 umfassen die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren, Expressionsplasmide und Oligonukleotide.

Tabelle 5.2: Liste der Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz/Herkunft
Klonierung			
p103B3.1	Amp	<i>acbHFG</i> in pUC18	M. Jarling, AG Prof. Piepersberg (Wuppertal)
pASK-IBA7		Expressionsvektor, p_{tet} , N-term. Strep-TagII	IBA-GmbH (Göttingen)
pBAD/HisA	Amp	Expressionsvektor, p_{araBAD} , N-term. (His) ₆ -Tag	Invitrogen (Karlsruhe)
pFSA14	Amp	<i>malE_{A.a.}</i> in pGem-t	SCHEFFEL, 2004
pLysS	Cam	p_{tet} , <i>gene 1</i> (T7-Lysozym)	STUDIER, 1991
pPWW49-GenPoly	Tsr/Amp	Shuttlevektor, ori pUC18, ori pIJ101, <i>ermEp</i>	DOUMITH <i>ET AL.</i> , 2000, über U. Wehmeier
pET19b	Amp	Expressionsvektor, p_{T7lac} , N-term. (His) ₁₀ -Tag	Novagen
pET22b	Amp	Expressionsvektor, p_{T7lac} , C-term. (His) ₆ -Tag, <i>pelB</i> -Signalsequenz	Novagen
pUC18/19	Amp	Klonierungsvektor, p_{lac}	YANISCH-PERRON <i>ET AL.</i> , 1985
pQE9	Amp	Expressionsvektor, p_{T5} , N-term. RGS-(His) ₆ -Tag	Qiagen (Hilden)
PQE60	Amp	Expressionsvektor, p_{T5} , C-term. (His) ₆ -Tag	Qiagen (Hilden)
pOFX tac-SL1	Kan	<i>groES groEL</i> auf pOFX, p_{tac}	CASTANIÉ <i>ET AL.</i> , 1997
Expression			
pCB2	Amp	<i>acbH</i> in pBAD/HisA, Cys1Met	diese Arbeit
pCB3	Amp	<i>acbH</i> in pASK-IBA7, Cys1Met	diese Arbeit

pCB5	Amp	<i>malE</i> in pQE9	diese Arbeit, Abbildung 5.1
pCB6	Amp	<i>acbH</i> in pQE9, Cys1Met, Thr430Ala, Ile431Asp	diese Arbeit
pCB7	Amp	<i>acbH</i> in pQE9, Cys1Ala, Thr430Ala, Ile431Asp	diese Arbeit
pCB8	Amp	<i>acbH</i> in pQE60, Cys1Met, Thr430Ala, Ile431Asp	diese Arbeit
pCB9	Amp	<i>acbH</i> in pET19b, Cys1Met, Thr430Ala, Ile431Asp	diese Arbeit
pCB10	Amp	<i>acbH</i> in pET19b, Cys1Met	diese Arbeit, Abbildung 5.2
pCB11	Amp	pCB10 ohne <i>NdeI</i> -Schnittstelle vor <i>acbH</i>	diese Arbeit, Abbildung 5.3
pCB12	Tsr/ Amp	(His) ₁₀ - <i>acbH</i> von pCB11 amplifiziert in pPWW49-GenPoly	diese Arbeit, Abbildung 5.4
pCB14	Amp	<i>acbH</i> in pET22b, Cys1Met	diese Arbeit

Tabelle 5.3: Liste der Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Konstruktion/ Amplifikation von
PCR		
acbH1, 5' ⁷ acbH2, 3'	gac gac ¹ CTC GAG ² ATG ³ GGC AGT GAC GAC AAG AGC ctt acc GGT ACC TCA TCA ⁴ GCG GAA AAT CGT CTT	<i>XhoI</i> , pCB2 <i>KpnI</i> , pCB2
acbH3, 5' acbH4, 3'	gac gac GGA TCC ATG GGC AGT GAC GAC AAG AGC GG acc agc AAG CTT TCA GCG GAA AAT CGT CTT CGC CT	<i>BamHI</i> , pCB3/4/6 <i>HindIII</i> , pCB3/4
acbH5, 3' acbH6, 5'	acc agc AAG CTT TCA GCG GAA ATC GGC CTT CGC CTG gac gag GGA TCC GCC GGC AGT GAC GAC AAG AGC GGG	<i>HindIII</i> , pCB6/7 <i>BamHI</i> , pCB7
acbH7, 5' acbH8, 3'	gac cgg gCC ATG GGC AGT GAC GAC AAG AGC GGG ACG agc ccc AGA TCT ⁵ GCG GAA ATC GGC CTT CGC CTG GTC	<i>NcoI</i> , pCB8/14 <i>BglII</i> , pCB8
acbH9, 5' acbH10, 3'	gac gag CAT ATG GGC AGT GAC GAC AAG AGC GGG ACG acc agc GGA TCC TCA GCG GAA ATC GGC CTT CGC CTG	<i>NdeI</i> , pCB9 <i>BamHI</i> , pCB9
acbH12, 5' acbH13, 3'	c gag cgg CAT ATG GGC AGT GAC GAC AAG AGC GGG ACG ccc gcc GGA TCC CCG GTC GAA TGG TCG GGG TCA TCA	<i>NdeI</i> , pCB10 <i>BamHI</i> , pCB10/12
acbH16, 5'	t ata tgg CAT ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT	<i>NdeI</i> , pCB12
acbH17, 3'	agc ccc GGA TCC ⁵ GCG GAA AAT CGT CTT CGC CTG	<i>BamHI</i> , pCB14
malE1pQE, 5' malE2pQE, 3'	acg cga GGA TCC AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG cta aag AAG CTT TTA CTT GGT GAT ACG AGT CTG	<i>BamHI</i> , pCB5 <i>HindIII</i> , pCB5

Frs24, 5'	TTA TCG GAT CCG CGG GAA CCT CGA ACG GTG GTC	<i>malE</i> von <i>A. acidocaldarius</i>
KH2, 3'	TTT AAA GGA TCC TTG TGC CAT GAT GCC TTT TTG	<i>malE</i> von <i>A. acidocaldarius</i>
<i>malE-S.coel1</i> , 5'	TGC GGC GGA GAC GGC GAC AGC GAC AGC GAG TCG GG	<i>malE</i> von <i>S. lividans</i>
<i>malE-S.coel2</i> , 3'	CTA CTT GCT GAA GTC CGG CAC CAG CTT GGC GAT GC	<i>malE</i> von <i>S. lividans</i>
Mutagenese		
acbH14	C GAC GAC GAC GAC AAG CAC ⁶ ATG GGC AGT GAC GAC AAG AGC	pCB11
acbH15	GCT CTT GTC GTC ACT GCC CAT GTG CTT GTC GTC GTC GTC G	pCB11
Hybridisierung		
fishingMBP	5'-Digoxigenin-GCC TCC ACC GAC GAG GTC ACC GCC CCG GCC CTG GAC GGC TAC TGC	PS ⁸ : ASTDEVTAPA LDGYC
fishingMBP2	5'-Digoxigenin-AAC TTC TA(CT) GAC CCG TA(CT) (AT)(GC)C TGG	PS: NFYDPYSW

¹ nicht-komplementäre Sequenz, die der eingeführten Schnittstelle angrenzt

² eingeführte Restriktionsschnittstellen

³ Austausch Cys zu Met oder Ala

⁴ Stopcodon

⁵ Deletion Stopcodon

⁶ Austausch Mutagenese (Eliminierung der Restriktionsschnittstelle für NdeI)

⁷ 5': 5'-Primer, 3': 3'-Primer

⁸ PS: Peptidsequenz

5.6 Genetische und Molekularbiologische Methoden

5.6.1. DNA-Präparationen

5.6.1.1. Plasmid-Präparationen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen von *E. coli* wurde prinzipiell mit dem CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System von Life Technologies durchgeführt.

5.6.1.2. Präparation chromosomaler DNA aus *Actinoplanes* sp. 50/110 und *Streptomyces lividans*

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte anfänglich in Anlehnung an das von POSPIECH & NEUMANN (1995) erstellte Protokoll durch enzymatische Lyse der Zellen. Später wurden die Zellen im Falle von *Actinoplanes* sp. mechanisch im Mörser aufgeschlossen.

Enzymatische Lyse: Nach dreitägiger Anzucht in NB-S-Medium (s. 5.4.2) wurden die pelletierten Zellen in 10 ml SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) resuspendiert. Parallel zur Lysozymbehandlung (1 mg/ml) erfolgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde zusätzlich mit 100 U/ml Mutanolysin. Nach der Zugabe von 1/10 Volumen 10 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K wurde die Suspension unter gelegentlichem Schütteln für zwei Stunden bei 55°C gehalten. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 g. Der Überstand wurde mit 1/3 Volumen 5 M NaCl

und 1 Volumen Chloroform versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand über das Protokoll von Pospiech und Neumann hinaus einer zweifachen Phenol/Chloroform-Behandlung unterzogen. Dazu wurde jeweils der Überstand mit 1/2 Volumen Phenol und 1/2 Volumen eines Isoamylalkohol/Chloroform-Gemisches (1 : 24) versetzt, gemischt und für 20 Minuten bei 8000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dieser Abtrennung verunreinigender Proteine wurde die DNA-haltige obere, wässrige Phase mit 1/3 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) gemischt und anschließend mit dreifachem Volumen eiskaltem Ethanol über Nacht bei – 20°C zur Fällung der DNA gehalten. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) mit 1 µg RNase gelöst.

Mechanische Lyse: Die Zellen wurden ebenso wie zur enzymatischen Lyse angezogen, pelletiert und in SET (allerdings hier mit 300 mM NaCl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren, in einen ebenfalls durch flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser überführt und mit dem eiskalten Stößel pulverisiert. Dabei wurde streng darauf geachtet, durch wiederholte Zugabe von fl. Stickstoff die Zellen bzw. pulverisierten Zellen konsequent in gefrorenem Zustand zu halten. In einen zweiten Mörser, der lediglich durch Halten auf Eis vorgekühlt war, wurde 1 Volumen des Gemisches Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zusammen mit 1 % SDS vorgelegt. In dieses Gemisch hinein wurden die pulverisierten Zellen gegeben und unter weiterem Stößeln gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation bei Raumtemperatur (5000 g, 20 Minuten) wurde die obere Phase mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol gemischt, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Aus dieser oberen Phase nun konnte durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 96 %igen Ethanol die DNA ausgefällt und abzentrifugiert (5000 g, fünf Minuten, 4°C) werden. Das DNA-Pellet wurde in kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und schließlich in 0,5 ml H₂O gelöst. Zum Abbau störender RNA-Moleküle wurde 1 µg RNase hinzugegeben.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit wurde die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia) gemessen. Nach HARWOOD & CUTTING (1990) konnte die Konzentration anhand folgender Formel berechnet werden:

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260} \times 0,063) - (\text{OD}_{280} \times 0,036)$$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gebildet. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 lagen reine DNA-Präparationen vor (SAMBROOK *ET AL.*, 1989).

5.6.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden ausgewählte DNA-Bereiche *in vitro* amplifiziert. Sowohl Plasmid-DNA als auch chromosomale DNA aus *E. coli*, *Actinoplanes* sp. und *S. lividans* dienten als Matrize (s. 5.6.1.2). Im Falle von *E. coli* wurde hierfür nicht das Chromosom isoliert, sondern lediglich 1 ml einer Übernachtskultur (LB-Vollmedium) für fünf Minuten gekocht und nach Zentrifugation (1 Minute, 13000g) 1 µl des resultierenden Überstandes als Template eingesetzt. Durch die Auswahl jeweils spezifischer Oligonukleotidprimer wurden die Amplifikate mit für die Klonierungen geeigneten Restriktionsschnittstellen versehen (s. Tab 5.3 und 5.6.8).

Die Amplifikationen erfolgten im TRIO-Thermoblock 48 der Firma Biometra und in Anlehnung an Vorschläge zur Profilgestaltung und Zusammensetzung der Reaktionen durch den Hersteller der DNA-Polymerase. In Abhängigkeit von der Größe und Art des Amplifikats (GC-Gehalt) und der generierten Oligonukleotidprimer variierten letztlich die PCR-Profile in der initiiierenden Denaturierungsdauer der DNA, in der Mg²⁺-Konzentration, in der Anlagerungstemperatur der Primer und in der Dauer für die Primerverlängerung. Konstant blieben das Endvolumen der Reaktionsansätze von 50 µl, die jeweilige Übersichtung mit Mineralöl, die ausschließliche Verwendung von 1U der Platinum®-Pfx-DNA-Polymerase und der Einsatz von final 2 µM eines dNTP-Gemisches so wie final 100 µM bzw. 10 µM Primer für die Amplifikation von DNA aus *Actinoplanes* sp. und *S. lividans* resp. *E. coli*.

Detaillierte Profilgestaltungen der Reaktionen sind in den entsprechenden Abschnitten zu Konstruktionen der verschiedenen Expressionsplasmide (5.6.8) und zu DNA-DNA-Hybridisierungen (5.6.9.4) aufgeführt.

5.6.3. DNA-Modifikationen

Die *in vitro* Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen, Dephosphorylierungen linearisierter Vektoren mit alkalischer Phosphatase und Ligationen zur Konstruktion von Expressionsvektoren erfolgten nach den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen.

Die Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nonradioactive“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim). Lediglich die Markierung der DNA-Fragmente, die aus den Peptidsequenzen abgeleitet wurden, wurde von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) übernommen.

5.6.4. Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese wurde mit Hilfe des „Quik[®]Change Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) genau nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese konnte durch Sequenzierung des Allels bestätigt werden.

5.6.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von ungeschnittener bzw. geschnittener DNA erfolgte mittels horizontaler Elektrophorese in 1 %igen Agarosegelen in 1 x TOE-Puffer (20 x Stocklösung: 9,68 % Tris, 1,36 % Na-Acetat und 0,74 % EDTA, pH8 mit konz. Essigsäure) nach SAMBROOK *ET AL.* (1989). Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 % SDS, 0,1 M EDTA und 0,1 % Bromphenolblau in 1 x TOE-Puffer) versetzt. Als Größenstandard diente eine Kb-DNA-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 V durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA im UV-Licht wurden die Gele für 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (4 µg/ml H²O) gefärbt und anschließend in Wasser gewaschen.

5.6.6. Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das CONCERT[™] Rapid Gel Extraction System von Life Technologies benutzt.

5.6.7. Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen von klonierten DNA-Fragmenten wurden durch die Firma AGOWA (Berlin) sowie durch Dr. M. Meixner (Dienstleistungen in der Molekularbiologie, DLMBC) vorgenommen.

5.6.8. Konstruktion ausgewählter Expressionsvektoren

Durch Sequenzierung der Konstrukte wurden die Erfolge der Klonierungen überprüft und konnten bestätigt werden.

5.6.8.1. Das Expressionsplasmid pCB5

Das *malE*-Gen wurde ohne die Sequenz für das Signalpeptid mit den Primern malE1pQE/malE2pQE in einer PCR mit 4 mM MgSO₄ vom Chromosom von *E. coli* amplifiziert. Die Profigestaltung war folgende: initiiierende Denaturierung: 3 Min, 94°C; Primeranlagerung: 60°C; Elongation: 68°C. Über die durch die Primer vorgegebenen Restriktionsschnittstellen wurde das Amplifikat in den Vektor pQE9 ligiert (Abbildung 5.1).

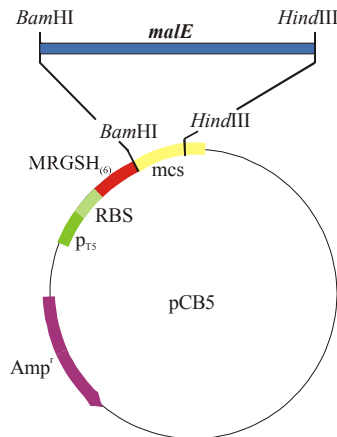


Abbildung 5.1: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB5. Durch diese Klonierung ist MalE vor der Aminosäure Lys 1 des reifen Proteins zusammen mit den Kodons der *BamHI*-Schnittstelle für Gly und Ser N-terminal mit einem Histidin-Tag mit der Sequenz MRGSH₍₆₎GS fusioniert.

5.6.8.2. Das Expressionsplasmid pCB10

Das *acbH*-Gen wurde ohne die Sequenz für das Signalpeptid mit den Primern acbH12/acbH13 in einer PCR mit 2 mM MgSO₄ vom Chromosom von *Actinoplanes sp.* 50/110 amplifiziert. Die Profigestaltung war folgende: initiiierende Denaturierung: 5 Min, 98°C; Primeranlagerung: 69°C; Elongation: 68°C. Über die durch die Primer vorgegebenen Restriktionsschnittstellen wurde das Amplifikat in den Vektor pET19b ligiert (Abbildung 5.2).

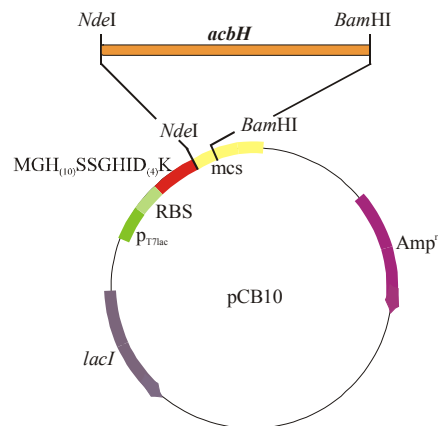


Abbildung 5.2: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB10. Durch diese Klonierung ist AcbH vor der Aminosäure Met, die das Cys 1 des reifen Proteins ersetzt, zusammen mit dem ersten Kodon der *NdeI*-Schnittstelle für His N-terminal mit einem Histidin-Tag mit der Sequenz MGH₍₁₀₎SSGHID₍₄₎KH fusioniert.

5.6.8.3. Das Expressionsplasmid pCB11

In Vorbereitung der Konstruktion des pCB12 wurde die *NdeI*-Schnittstelle vor dem *acbH*-Gen in pCB10 durch ortsspezifische Mutagenese (5.6.4) in einer PCR mit den Primern acbH14/acbH15 entfernt. Die Profigestaltung war folgende: initiiierende Denaturierung: 30 Sek, 95°C; Primeranlagerung: 55°C; Elongation: 8 Min, 68°C (Abbildung 5.3).

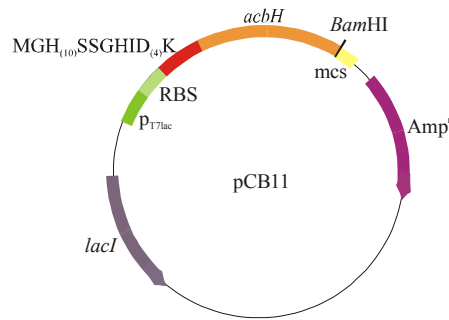


Abbildung 5.3: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB11. Durch die Mutagenese wurde die Sequenz der *NdeI*-Schnittstelle CATATG ortsspezifisch zu CACATG umgewandelt, so dass die Sequenz des resultierenden N-terminalen Histidin-Tags derjenigen des Expressionsproduktes von pCB10 entspricht.

5.6.8.4. Das Expressionsplasmid pCB12

Das *acbH*-Gen wurde zusammen mit der durch den Vektor pET19b vorgegebenen Sequenz für einen Histidin-Tag mit den Primern *acbH16/acbH13* in einer PCR mit 2 mM MgSO₄ von pCB11 amplifiziert. Die Profigestaltung war folgende: initiiierende Denaturierung: 1 Min, 95°C; Primeranlagerung: 69°C; Elongation: 68°C. Über die durch die Primer vorgegebenen Restriktionsschnittstellen wurde das Amplifikat in den Vektor pPWW49-GenPoly ligiert. Das Gen *acbH* steht unter der Kontrolle des konstitutiven *ermEp*-Promotors.

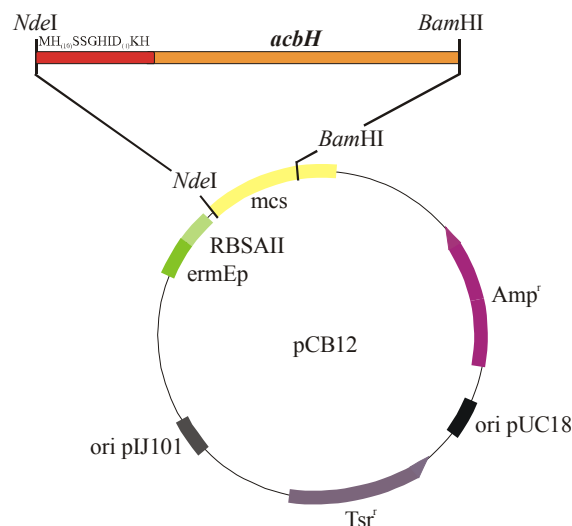


Abbildung 5.4: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB12. pPWW49-GenPoly ist ein Shuttle-Vektor und enthält zwei Origins der Replikation (ori pUC19 für Replikation in *E. coli*, ori pIJ101 für Replikation in *S. lividans*) sowie zwei Antibiotika-Resistenzgene (Ampicillin, Thiostrepton). Durch diese Klonierung ist *AcbH* vor der Aminosäure Met, die das Cys 1 des reifen Proteins ersetzt, mit der Sequenz MH₁₀₀SSGHID₄KH fusioniert

5.6.9. DNA-DNA-Hybridisierung

5.6.9.1. Southern Blotting

Die DNA wurde aus dem Agarosegel (s. 5.6.5) unter Vakuum (40 cm H₂O) mit einer LKB2016 VacuGene-Kammer (Pharmacia, Freiburg) in Anlehnung an das Protokoll der Hersteller auf eine Hybond-N⁺ Nylonmembran transferiert. Dabei wurde das Agarosegel so lange unter Depurinierungslösung gehalten, bis sich die Bromphenolblau-Bande der Lauffront gelb färbte. Die dafür notwendige Zeit betrug in der Regel 25 Minuten. Ebenso lange wurde danach das Gel zunächst unter der Denaturierungslösung, anschließend unter der

Neutralisierungslösung gehalten. Der DNA-Transfer erfolgte schließlich für eine Stunde unter der 20 x SSC-Lösung. Nach dem Blotting wurde die DNA drei Minuten mit UV-Licht bestrahlt und so auf der noch feuchten Nylonmembran durch crosslinking fixiert. Zur späteren Orientierung wurden noch der DNA-Standard und die Probestaschen unter UV-Licht markiert.

5.6.9.2. Hybridisierung

Die verschiedenen Hybridisierungen wurden prinzipiell so wie im „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche Diagnostics (Mannheim) vorgeschlagen durchgeführt. Die 30 minütigen Prähybridisierungen so wie die Hybridisierungen über Nacht mit 5 bis 50 ng DIG-markierter Sonde/ml Hybridisierungslösung (s. 5.6.3) erfolgten im Hybridisierungssofen (Mini Oven II, MWG-Biotech) bei Temperaturen zwischen 55°C und 59°C. Im Anschluss wurden die Nylonmembranen unter stringenten Bedingungen gewaschen, um ungebundene DNA-Sonden zu entfernen.

In einzelnen Fällen wurden auch gebundene DNA-Sonden wieder entfernt (stripping), um die entsprechenden Membranen für Rehybridisierungen einsetzen zu können.

5.6.9.3. Detektion

Die hybridisierten DNA-Sonden wurden über gebundene, Alkalische Phosphatase-gekoppelte Anti-DIG-Antikörper und das Chemilumineszenzsubstrat CSPD[®] detektiert. Die Chemilumineszenz wurde mittels Hyperfilm sichtbar gemacht.

5.6.9.4. Sonden

Zur Herstellung der Sonden wurden die jeweiligen *male*-Gene vom Chromosom (*S. lividans*) und von pFSA14 (*A. acidocaldarius*) in einer PCR mit jeweils 2 mM MgSO₄ amplifiziert und wie unter 5.6.3 beschrieben mit DIG markiert. Die Profigestaltung für beide Gene war folgende: initiiierende Denaturierung: 5 Min, 95°C; Primeranlagerung: 65°C; Elongation: 68°C.

Die Primer Frs24 und KH2 und das Plasmid pFSA14 wurden freundlicherweise von F. Scheffel zur Verfügung gestellt.

5.6.10. Transformation

5.6.10.1. Transformation von *E. coli*

E. coli Zellen wurden entweder nach der CaCl₂-Methode (SAMBROOK *ET AL.*, 1989) transformiert oder – zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei Ligationsansätzen – mittels Elektroporation. Hierfür wurden Zellen von *E. coli* JM109 nach dem Protokoll des Herstellers des Elektroporationsgerätes Easyject (Eurogentec, Belgien) kompetent gemacht. Die Transformation über Elektroporation erforderte die Entsalzung des Ligationsansatzes durch eine Butanolfällung. Dazu wurde der Ligationsansatz mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt, mit 450 µl n-Butanol versetzt und für zehn Sekunden gevortext. Nach 15 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und in 10 µl H₂O gelöst. 5 bis 10 µl wurden dann für die Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium resuspendiert, für eine Stunde bei 37°C geschüttelt und auf eine geeignete LB-Antibiotikum-Platte aufgetragen. Schließlich erfolgte ein Einzelkolonieausstrich, von dem eine Dauerkultur angelegt wurde.

5.6.10.2. Transformation von *S. lividans*

Für die Transformation von *S. lividans* war es zunächst notwendig, Protoplasten herzustellen.

Herstellung von Protoplasten: Für eine Vorkultur wurden 5 ml TSB-Medium mit 5 % PEG8000, 0,5 % Glycerin und 5 mM MgCl₂ von einer Sporensuspension angeimpft. Die Hauptkultur wurde im gleichen Medium für 16 Stunden gezogen, durch Zentrifugation (4000 g, 10 Minuten, 20°C) geerntet und dann mit 20 ml einer 10,3 %igen Saccharoselösung gewaschen. Das Zellpellet wurde schließlich in 8 ml P-Puffer resuspendiert, auf 1 mg/ml Lysozym eingestellt und so lange bei 37°C inkubiert, bis mikroskopisch betrachtet überwiegend

Protoplasten und kein Mycel mehr erkennbar waren. Nach einer weiteren Zugabe von 8 ml P-Puffer wurde die Suspension durch Haushaltswatte (gestopft in eine Einwegspritze und autoklaviert) filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (3500 rpm in der Eppifuge, 10 Minuten, 20°C) und das Pellet in 1 ml P-Puffer resuspendiert. Zu Aliquots von 50 µl wurden die Protoplasten zunächst bei – 20°C über Nacht eingefroren und schließlich bei – 80°C gelagert (Motto: langsam einfrieren – schnell auftauen).

P-Puffer (HOPWOOD, 1985)	103 g	Saccharose
	0,5 g	K ₂ SO ₄
	2,0 g	MgCl ₂
	2 ml	Spurenelemente-Lösung

ad 800 ml H₂O, autoklavieren und Zugabe von

100 ml	TES-Puffer (5,73 %, pH 7,2)
1 ml	KH ₂ PO ₄ (0,5 %)
100 ml	CaCl ₂ (3,68 %)

Transformation: Die zu je 50 µl aliquotierte Protoplastensuspension wurde zügig aufgetaut, zentrifugiert (3500 rpm in der Eppifuge, sieben Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Protoplasten wurden ebenfalls vorsichtig wieder in 50 µl P-Puffer resuspendiert und dann das Plasmid zugegeben (maximal 10 µl). Nach Zugabe von 200 µl T-Puffer wurde der Ansatz mit der Pipette durchmischt und unmittelbar darauf 1 ml P-Puffer hinzugefügt. Sofort danach wurden von der Suspension unterschiedliche Volumina auf SPMR-Platten aufgetragen. Die Platten inkubierten für einen Tag bei 30°C und wurden dann erst zur Selektion mit dem Antibiotikum Thiostrepton überschichtet und für weitere fünf bis sieben Tage inkubiert. Schließlich erfolgte ein Einzelkoloniausstrich auf SMA-Thiostrepton-Platten und nach einigen Tagen konnte eine Sporensuspension (s. 5.4.1) angelegt werden.

T-Puffer (HOPWOOD, 1985)	25 ml	10,3 % Saccharose
	0,2 ml	Spurenelemente-Lösung
	1 ml	K ₂ SO ₄ (2,5 %)

ad 75ml H₂O, autoklavieren und Zugabe von

0,2 ml	CaCl ₂ (3,68 %)
0,5 ml	Tris/Maleinsäure (1 M, pH 8)

Zum Gebrauch 1:1 (v:w) mit sterilem PEG8000 im 80°C heißen Wasserbad mischen.

5.7 Analytische und Biochemische Methoden

5.7.1. Zellaufschluss und Zellfraktionierung

5.7.1.1. Zellaufschluss in einer French Pressure Cell

E. coli: Die Zellen aus den Hauptkulturen (s. 5.4.2) wurden pelletiert (8000 g, 20 Minuten, 4°C) und in 1 ml Aufschlusspuffer pro 50 ml Kultur OD₆₅₀ = 1 aufgenommen. Diese Suspension wurde einmal bei 16 000 psi durch die große kalte Kammer einer French Pressure Cell gepresst. Direkt im Anschluss erfolgte die Zellfraktionierung (s. 5.7.1.3).

Aufschlusspuffer	20 mM	Tris/HCl, pH 7,2
	5 %	Glycerin
	300 mM	NaCl
	20 mM	β-Mercaptoethanol
	0,1 mM	PMSF
	Spatelspitze	DNase

Actinoplanes sp.: Aus den Hauptkulturen (s. 5.4.2) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums die Zellen geerntet (5000 g, 20 Minuten, 4°C) und je nach Zelldichte in 5 ml bis 15 ml Minimalmedium MNS mit 0,1 mM PMSF resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase wurde die Suspension zweimal hintereinander bei 14 000 psi durch die kleine kalte Kammer einer French Pressure Cell gepresst. Direkt im Anschluss erfolgte die Zellfraktionierung (s. 5.7.1.3).

5.7.1.2. Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung

Streptomyces lividans: Aus den Hauptkulturen (s. 5.4.2) wurden die Zellen geerntet (5000 g, 20 Minuten, 4°C) und in geeignete Volumina Minimalmedium MNS mit 0,1 mM PMSF resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze DNase wurde die Suspension einer Ultraschallbehandlung mit einem BRANSON-Sonifier 250 (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) unterzogen. Die stets auf Eis gehaltenen Zellen wurden dabei drei mal für eine Minute mit jeweils einer Minute Pause bei 40 % bis 60 % Output beschallt. Direkt im Anschluss erfolgte die Zellfraktionierung (s. 5.7.1.3).

5.7.1.3. Zellfraktionierung

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellbestandteile von *E. coli*, *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces lividans* in gleicher Weise nach einer modifizierten Methode von HOBSON *ET AL.* (1984) fraktioniert. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden bei 14.000 g (15 min, 4 °C) als Low Speed Pellet (LSP) abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Membranen wurden dann durch Ultrazentrifugation bei 200.000 g (1 h, 4 °C) vom Cytosol getrennt. Membranen und LSPs wurden in geeigneten Volumina des jeweiligen Puffers, der auch für den Zellaufschluss verwendet wurde, resuspendiert. Die einzelnen Zellfraktionen wurden schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

5.7.2. Präparation des Osmoschock-Überstandes

Die für die Fällungsexperimente eingesetzten Periplasmafraktionen (s. 5.7.9) wurden so wie bei NOSSAL & HEPPEL (1966) beschrieben durch eine Osmoschock-Behandlung der Zellen *E. coli* K12 gewonnen. Die Zellen wuchsen über Nacht in 25 ml Minimalmedium M63 mit 0,5 % Maltose, um die Expression des chromosomal kodierten Gens *malE* zu induzieren. Ein MalE freier Osmoschock-Überstand wurde von solchen Zellen präpariert, denen zum Wachstum alternativ 0,5 % Glukose angeboten wurde. Abschließend wurden die Fraktionen zweimal gegen 1000-faches Volumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert.

5.7.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Gehalt an Protein verschiedener Lösungen wurde in Abhängigkeit von der Abkunft der Proben mittels zweierlei Verfahren ermittelt.

Nach der Methode von DULLEY & GRIEVE (1975), basierend auf dem Protokoll von LOWRY *ET AL.* (1951), wurde der Proteingehalt ganzer Zellen von *Actinoplanes* sp. bestimmt. Dazu wurden geeignete Aliquots der Kulturen pelletiert und drei „Freeze-Thaw“-Zyklen (Wechselbad zwischen 95 °C und flüssigem Stickstoff) unterzogen. Je nach Zelldichte wurden die Pellets dann in bis zu 800 µl 1 N NaOH-Lösung resuspendiert und unter Schütteln bis zur Lyse der Zellen bei 95 °C gehalten. Als Standardprotein diente RSA, welches auf gleiche Weise mit 1 N NaOH (3 : 1) behandelt wurde. Für die Zusammenstellung der Lowry-Lösung wurde das Na₂CO₃ nicht in NaOH angesetzt sondern in H₂O.

Die Mengen an gereinigtem Protein so wie Proteingehalte von Zellfraktionen wurden mit Hilfe des „BCA-Protein-Assay-Kit“ der Firma Pierce (Rockford, USA) quantifiziert. Dabei wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll geeignete Aliquots der einzelnen Proben mit dem gleichen Puffer, in dem diese bereits vorlagen, auf 50 µl aufgefüllt, mit 1 ml Reagenzgemisch versetzt und für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Als Standardprotein diente RSA, welches ebenfalls mit dem jeweils entsprechenden Puffer behandelt wurde.

5.7.4. Gelelektrophoretische Darstellung von Proteinen

Zur Darstellung von Proteinmustern wurden SDS-Polyacrylamidgele nach LAEMMLI (1970) eingesetzt. Bei allen Gelen betrug im Sammelgel die Acrylamidkonzentration 4,9 % und die Bisacrylamidkonzentration 0,13 %. Im Trenngel lag die Acrylamidkonzentration bei 10 % oder 12,5 % und die Bisacrylamidkonzentration bei 0,27 % resp. 0,32 %. Die Elektrophorese von Minigelen (Trenngellänge etwa 6 cm, Geldicke 0,75 mm) erfolgte in einer mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllten Kammer des Typs Mini-ProteanII™ der Firma BioRad (München) bei einer Spannung von 150 V. Die Proben wurden entsprechend der Proteinkonzentration mit 2 x oder 10 x Probenpuffer versetzt. Zur Bestimmung der relativen molaren Massen der aufgetrennten Proteine wurde der „broad range“ Standard (BioRad), der zusätzlich das Maltose-Bindeprotein (40 kDa) von *E. coli* enthält, mitgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch ein zehnminütiges Bad in 40 % Isopropanol/10 % Essigsäure im Gel fixiert und anschließend in einer Serva-Blau R.-Lösung durch zweiminütiges Erhitzen in einer Mikrowelle gefärbt. Abschließend wurde das Gel zur Entfärbung des Hintergrundes in 10 % Essigsäure gewaschen (WALTER, 1992, WONG *ET AL.*, 2000).

Elektrophoresepuffer (10 x)	0,25 M	Tris
	1,92 M	Glycin
	35 mM	SDS
Probenpuffer (2 x)	4 %	SDS
	25 %	Sammelgelpuffer
	30 %	Glycerin
	10 %	β-Mercaptoethanol
	0,002 %	Bromphenolblau
Probenpuffer (10 x)	20 %	SDS
	50 %	Sammelgelpuffer (5 x
	30 %	Glycerin
	5 %	β-Mercaptoethanol
	0,05 %	Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,76
	0,4 %	SDS
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,6
	0,4 %	SDS

5.7.5. Proteinelution aus SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Gewinnung eines polyklonalen Anti-AcbH-Antiserums wurde das Antigen AcbH aus Polyacrylamid-Gelen eluiert. Dafür wurden nach Überexpression des *acbH* von pCB7 (durchgeführt wie für pCB10 unter 5.7.12 beschrieben, Anzucht ohne Cam) auf 5 mg berechnete LSPs (5.7.1.3) in 10 %igen SDS-Gelen (Trenngellänge 12 cm) unter Standardbedingungen (5.7.4) aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Proteine aus zwei Referenzstreifen wurde ein Gelstreifen mit nicht fixiertem AcbH ausgeschnitten und für die Elektroelution in einem Elektro-Eluter Modell 422 nach Angaben des Herstellers (BioRad) eingesetzt.

5.7.6. Western Blotting und Immunodetektion

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran erfolgte modifiziert nach TOWBIN *ET AL.* (1979). Dazu wurden Gel, Membran und Filterpapiere in Blotpuffer equilibriert. Für den Transfer wurde die „Trans-Blot SD semi-dry“-Apparatur nach Angaben des Herstellers (BioRad, München) verwendet. Die Transferzeit betrug 25 Minuten bei einer konstanten Spannung von 20 Volt. Im Anschluss wurde die Membran mit Ponceau (0,2 % Ponceau S in 3 % TCA) gefärbt, um den Proteinstandard zu markieren und schließlich mit TNT wieder entfärbt. Für die Immunodetektion gesuchter Proteine wurde im weiteren Verlauf die Membran über Nacht bei 4°C in 10 ml 2 % RSA Fraktion V (in TNT) inkubiert, um unbelegte Protein-Bindungsstellen abzusättigen. Direkt in diese

Lösung hinein wurde dann eine geeignete Antiserumverdünnung des primären Antikörpers gegeben. Nach einstündiger Inkubation unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur wurde die Membran intensiv mit TNT gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) 1 : 30 000 in 10 ml TNT ebenfalls für eine Stunde geschwenkt. Dieser war mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert und konnte so mit Hilfe des „Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus System“ nachgewiesen werden. Die Chemilumineszenz wurde mittels Hyperfilm bzw. im Lumi-Imager sichtbar gemacht. Im Falle des Strep-Tag-AcbH-Fusionsproteins wurde nach dem Protokoll der Herstellerfirma IBA-GmbH (Göttingen) verfahren.

Blotpuffer	25 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol
TNT	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	50 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20
Antiseren	α -AcbH	1 : 60 000
	α -MalE	1 : 20 000
	α -MsiK	1 : 40 000
	α -RGS	1 : 10 000
	α -(His) ₁₀	1 : 10 000
	α -(His) ₅	1 : 20 000

5.7.7. Transportversuche

Die Aufnahme radioaktiv markierter Substrate in Zellen von *E. coli* und *Actinoplanes* sp. wurde durch Transportversuche analysiert, die prinzipiell so wie bei SCHNEIDER & WALTER (1991) für das Arbeiten mit *S. typhimurium* beschrieben durchgeführt wurden. Zum Abzug unspezifischer Bindung der radioaktiven Substrate wurden zur Kontrolle gekochte Zellen eingesetzt.

Escherichia coli: Die Zellen wurden in Minimalmedium M63 entweder nur mit 0,5 % Maltose bzw. 0,5 % Glycerin oder zusätzlich mit 0,5 % Acarbose bis zu einer OD₆₅₀ von 0,8 kultiviert (s. auch 5.4.2). Nach der Ernte (5000 g, 15 Minuten, 4°C) wurden die Zellen zwei mal in M63 gewaschen und für die Messungen zu OD₆₅₀ = 7,5 resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf Eis gehalten und der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 10 µl dieser Suspensionen zu den einzelnen Messansätzen (985 µl M63, 5 µl ¹⁴C-Lösung). Zur Verifizierung der Spezifität des Transportes enthielten weitere Messansätze zusätzlich 100 µM unmarkierte Maltose bzw. Acarbose. Nach 10, 20, 30 und 40 Sekunden wurden Aliquots von 180 µl entnommen, in einem Vakuum-Filtrationsgerät bei 20 Torr über Membranen (s. 5.1) gefiltert und mit jeweils 5 ml eiskaltem M63 nachgewaschen. Abschließend wurden die Filter mit den Zellen darauf in 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Aquasafe 300 plus) gegeben und die intrazellulär akkumulierte Maltose bzw. Acarbose konnte über die Messung der Radioaktivität (cpm) in einem Zählgerät der Firma Packard GmbH (Modell 1600 TR) quantifiziert werden.

¹⁴ C-Acarbose/Ansatz	5,7 nmol	¹⁴ C-Acarbose ⁽¹⁾
	ad 5 µl	M63
¹⁴ C-Maltose/Ansatz	0,5 nmol	[U- ¹⁴ C]-Maltose ⁽¹⁾
	5,2 nmol	kalte Maltose
	ad 5 µl	M63

Berechnung
$$\frac{\text{cpm} \times \text{Volumen (1000 µl/180 µl)} \times \text{Faktor F}}{(2)} = \text{nmol Substrat/10}^9 \text{ Zellen/min}$$

 Zelldichte (10 µl x OD/1000 µl) x Zeit

Actinoplanes sp.: Aus den Hauptkulturen (s. 5.4.2) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums Zellen aus jeweils 15 ml geerntet (5000 g, 20 Minuten, 4°C), zwei mal mit Minimalmedium MNS gewaschen, in 0,2 bis 1,0 ml MNS aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gehalten. Von diesen Suspensionen wurden 60 µl für die Transportmessungen eingesetzt und zwei mal 60 µl für Doppelbestimmungen der Ganzzell-Proteinmenge (s. 5.7.3) entnommen, um die ermittelten Transportdaten auf mg Protein zu beziehen⁽³⁾

Das Endvolumen eines Messansatzes betrug stets 1 ml (aufgefüllt mit MNS). Neben den Zellen enthielten solche Ansätze, die zur Ermittlung der Substratspezifität der Transportaktivitäten (Hemmstudien) durchgeführt wurden, zusätzlich andere, verschiedene Zucker in einer Konzentration von jeweils 1 mM. Die so vorbereiteten Messansätze inkubierten vor dem Reaktionsstart für eine Minute und dann während der gesamten Messzeit bei 30°C und 1100 rpm, um für die Zellen optimale Temperaturbedingungen zu erreichen. Außerdem wurde so gewährleistet, dass die Zellpellets gleichmäßig in der Lösung verteilt waren und nicht zu Boden des Reaktionsgefäßes sanken. Durch Zugabe von 10 µl der radioaktiven Maltose-, Maltotriose- bzw. Acarboselösung wurde die Messung gestartet. Nach einer, drei, fünf und sieben Minuten wurden Aliquots von 180 µl entnommen, in einem Vakuum-Filtrationsgerät bei 20 Torr über Membranen (s. 5.1) gefiltert und mit jeweils 5 ml eiskaltem MNS nachgewaschen. Das weitere Verfahren zur Quantifizierung der intrazellulär akkumulierten Maltose, Maltotriose bzw. Acarbose erfolgte wie oben für die Messungen mit *E. coli* beschrieben.

¹⁴ C-Lösung/Ansatz	1 nmol oder 5,7 nmol 50 nmol ad 10 µl	¹⁴ C-Substrat ([U- ¹⁴ C]-Maltose oder [U- ¹⁴ C]-Maltotriose) ¹⁴ C-Acarbose kaltes Substrat (Maltose oder Maltotriose, keine Acarbose) MNS
-------------------------------	--	--

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter des Maltosetransports variierte der Anteil kalter Maltose in der ¹⁴C-Lösung von Null bis 60 nmol.

Berechnung cpm x Volumen (1000 µl/180 µl) x Faktor F ⁽²⁾ nmol Substrat/Messansatz

⁽¹⁾ Je nach Charge hatte die radioaktive Maltose eine Spezifische Aktivität von 610 mCi/mmol (Amersham Pharmacia Biotech), 594 mCi/mmol oder 570 mCi/mmol (ICN). Die Spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Maltotriose lagen bei 900 mCi/mmol und 800 mCi/mmol (ARC-Biotrend), die der ¹⁴C-Acarbose bei 50 mCi/mmol (hier war lediglich der Acarviosyl-Rest markiert).

⁽²⁾ In die Berechnung der Transportdaten wurde ein Faktor F einbezogen, der auf der Basis 1 Ci = 2,2 x 10¹² cpm den Zusammenhang zwischen insgesamt transportiertem Substrat (heißes und kaltes) und gezählter Radioaktivität in cpm berücksichtigt. Für die z. B. oben beschriebene ¹⁴C-Maltoselösung ergibt sich bei einer Spezifischen Aktivität von 610 mCi/mmol folgender Faktor F:

$$\begin{aligned}
 &1 \text{ nmol } ^{14}\text{C-Maltose} = 0,61 \text{ } \mu\text{Ci} = 1,34 \times 10^6 \text{ cpm} \\
 &1 \text{ nmol } ^{14}\text{C-Maltose} + 50 \text{ nmol Maltose} = 51 \text{ nmol Gesamtmaltose} \\
 &\text{d. h.} \quad 51 \text{ nmol Gesamtmaltose entspricht } 1,34 \times 10^6 \text{ cpm} \\
 &\text{also ist Faktor F:} \quad 38 \times 10^{-6} \text{ nmol Maltose/cpm}
 \end{aligned}$$

⁽³⁾ Die Zellzahlen von *Actinoplanes sp.* konnten aufgrund des pelletartigen Wachstums nicht über die Optische Dichte quantifiziert werden. So war es weder möglich, die Suspensionen für die Messungen auf gleiche Zellmengen einzustellen noch die Transportraten auf Zellzahlen zu beziehen. Da in Abhängigkeit von Wachstumsmedium und Erntezeitpunkt pro 15 ml entnommener Kultur deutlich sichtbar variierende Mengen an Zellen vorlagen, wurden die Volumina zur Resuspension der gewaschenen Zellen nun derart angepasst, dass per Augenmaß in etwa ähnliche Zelldichten entstanden. Trotz dieser Verfahrensweise ergaben die Doppelbestimmungen der Ganzzell-Proteine für jede Kultur abweichende Werte, so dass im Rückschluss dennoch variierende Zellzahlen in den einzelnen Messansätzen vorhanden waren. Eine Beeinflussung der Transportraten durch schwankende Zellzahlen konnte jedoch in einem Kontrollexperiment, in dem unterschiedliche Zellmengen der selben Kultur eingesetzt wurden, ausgeschlossen werden.

5.7.8. Maltose-PTS-Test

Die Beteiligung eines Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängigen Phosphotransferase-Systems (PTS) am Import von Maltose bei *Actinoplanes sp.* wurde über einen Test auf PEP-abhängige Phosphorylierung von [U-¹⁴C]-Maltose nach PARCHE ET AL. (1999) überprüft. Ähnlich wie unter 5.7.1.1 beschrieben wurden Zellaufschlüsse von *Actinoplanes sp.* hergestellt, lediglich der Aufschlusspuffer hatte eine andere Zusammensetzung: 10 mM Tris/HCl, pH 7, 200 mM NaCl, 0,1 mM PMSF und 5 mM DTT. Nach Abzentrifugation der LSPs wurden die membranenthaltigen, cytosolischen Überstände gegen 1000-faches Volumen 25 mM Tris/HCl, pH 7 dialysiert, um metabolisches ATP und PEP zu entfernen. In einem Endvolumen von 100 µl (aufgefüllt mit 25 mM Tris/HCl, pH 7) wurden jeweils 200 µg dieser Proteinextrakte mit 50 µl PTS-Mix gemischt und für fünf Minuten bei 30°C vorinkubiert. Durch Zugabe von 10 µl [U-¹⁴C]-Maltose (51 µM) wurden die Reaktionen gestartet und die

Ansätze weitere 30 Minuten inkubiert. Um schließlich vorhandene phosphorylierte $[U-^{14}C]$ -Maltose aus den einzelnen Extrakten zu separieren, wurden die Ansätze auf Säulen mit 1,5 ml Anionenaustauschmatrix (Dowex 1 x 2, equilibriert mit 2 ml 0,2 M HCl und dann gewaschen mit 2 ml A. dest) pipettiert. Nach Waschung mit dreifachem Säulenvolumen A. dest erfolgte die Elution mit 2 ml 0,2 M HCl. Die Eluatfraktionen wurden in Szintillationsröhrchen aufgefangen und mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Über die Messung der Radioaktivität (cpm) in einem Zählgerät der Firma Packard GmbH (Modell 1600 TR) konnte dann das Vorhandensein phosphorylierter $[U-^{14}C]$ -Maltose überprüft werden.

Zur Überprüfung des Gelingens dieser Methode wurden solche Experimente in gleicher Weise auch mit Extrakten von *E. coli* K12 durchgeführt. Dabei wurde die Phosphorylierung von Methyl- α -D- $[U-^{14}C]$ -glukopyranosid (12,5 μ M) durch Extrakte von Zellen nach Wachstum in M63 mit 0,5 % Glukose bzw. vergleichend Maltose nachvollzogen.

PTS-Mix	5 mM	DTT
	5 mM	PEP
	5 mM	MgCl ₂
	25 mM	Tris/HCl, pH 7
¹⁴ C-Lösung/Ansatz	0,1 nmol	$[U-^{14}C]$ -Maltose ⁽¹⁾ (s. 5.7.7)
	5 nmol	kalte Maltose
	ad 10 μ l	Tris/HCl, pH 7

5.7.9. Zuckerbindungsstudien in Fällungsexperimenten

Die Interaktion von Acarbose mit dem Maltose-Bindeprotein MalE (wt) aus *E. coli* K12 wurde in Bindungsstudien mit ¹⁴C-Maltose nach RICHARME & KEPES (1983) untersucht. Für diese Studien wurden Osmoschock-Überstände verwendet, die von Zellen von *E. coli* K12 nach Wachstum in Minimalmedium M63 mit 0,5 % Maltose bzw. alternativ 0,5 % Glukose präpariert wurden (s. 5.7.2). Die Fluids wurden durch Ultrafiltration ankonzentriert und gegen 2000-faches Volumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert. Von den so gewonnenen periplasmatischen Fraktionen wurden je 120 μ g Gesamtprotein für die Studien eingesetzt, daran anteilig war MalE mit ca. 5 %. In einem Endvolumen von 100 μ l (aufgefüllt mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) inkubierten diese einzelnen Ansätze zusammen mit 5 μ M $[U-^{14}C]$ -Maltose (300 nCi ⁽¹⁾, s. 5.7.7) bei 37°C. Nach 30 Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml einer gesättigten NH₄SO₂-Lösung gestoppt. Diese Mischung wurde sofort in einem Vakuum-Filtrationsgerät bei 20 Torr über Membranen (s. 5.1) gefiltert. Die Filter wurden dann noch mal mit 5 ml der gesättigten NH₄SO₂-Lösung und anschließend mit 5 ml A. dest gewaschen. Für die Quantifizierung der in den Proteinaggregaten gebundenen $[U-^{14}C]$ -Maltose wurde mit den Filtern so wie bereits für die Transportmessungen (5.7.7) beschrieben verfahren. Um schließlich den Einfluss von Acarbose zu testen, wurden einzelne Messansätze zunächst mit verschiedenen Acarbose-Konzentrationen für eine Minute, ebenfalls bei 37°C, vorinkubiert und dann erst die Reaktion durch Zugabe von $[U-^{14}C]$ -Maltose gestartet.

5.7.10. Zuckerbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz

Die Suche nach Substraten des Bindeproteins AcbH aus *Actinoplanes* sp. erfolgte mit Hilfe einer Methode, durch die es möglich ist, biomolekulare Interaktionen in Echtzeit zu beobachten und zwar ohne dass die beteiligten Moleküle markiert sein müssen. Die Biomolekulare Interaktions-Analysen (BIA) macht sich dabei die Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR: Surface Plasmon Resonance) zunutze, mit der minimale Masseänderungen (< 1 pg/mm²) auf der Oberfläche eines Sensorchips detektiert werden können. Das daraus resultierende Sensorgramm zeigt einen Plot des SPR-Signal in RU (Resonance Units) gegen die Zeit in Sekunden (s. Abb. 5.5). Das SPR-Signal und die an der Chip-Oberfläche gebundenen Makromoleküle stehen in enger Korrelation zueinander (1000 RU = 1 ng/mm²) und verhalten sich bis zu 50 ng/mm² linear. Die Studien wurden an dem Gerät BIACORE X der Firma BIACORE (Schweden) mit der dazugehörigen Software und einem Ni-NTA-Sensorchip, der speziell für die Immobilisierung von HisTag-Fusionsproteinen geeignet ist, bei 25°C durchgeführt. Als Laufpuffer wurde der Puffer gewählt, in dem das gereinigte und renaturierte (His)₁₀-AcbH vorlag (s. 5.7.13).

Zur Analyse wurde gereinigtes (His)₁₀-AcbH auf der Oberfläche eines zuvor nach Herstellerangaben aktivierten Ni-NTA-Sensorchips immobilisiert. Bei einer Flußrate von 10 µl/min wurde das Protein in Etappen injiziert, so dass sich eine Beschichtung von durchschnittlich 13.000 RU ergab. Die zu testenden Zuckersubstrate wurden als verschieden konzentrierte Lösungen (angesetzt in Laufpuffer) bei einer Flußrate von ebenfalls 10 µl/min injiziert. Die Beobachtung von Assoziation und Dissoziation der Zucker an die immobilisierten Proteine erfolgte jeweils für zwei Minuten.

Als Referenzprotein diente (His)₁₀-MalK, das mir freundlicherweise von Bettina Blüschke zur Verfügung gestellt wurde.

Die Regeneration des Sensorchips erfolgte nach Herstellerempfehlung mit SDS und EDTA.

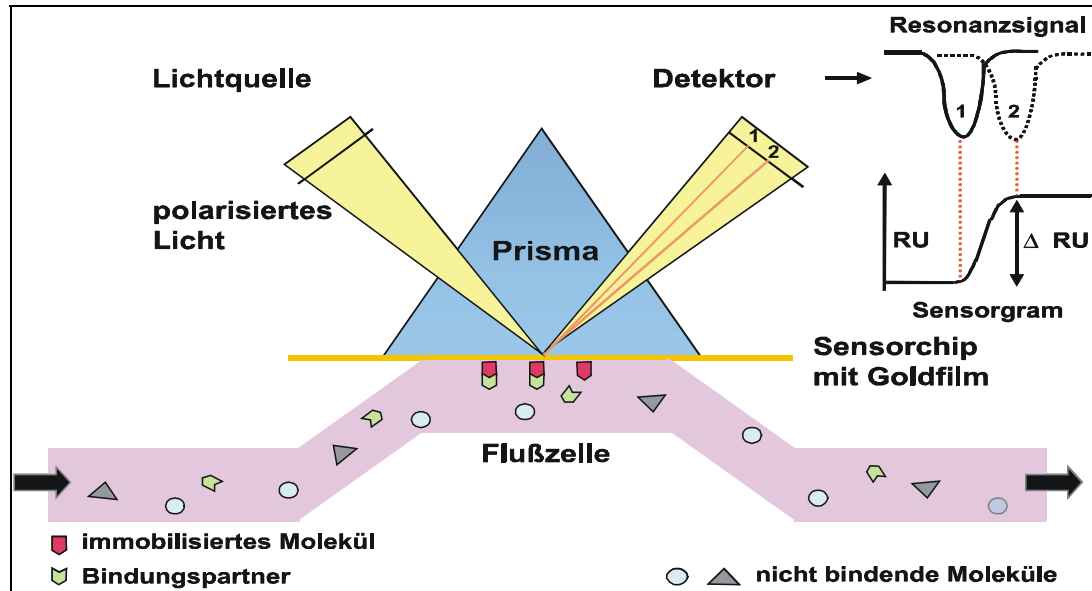


Abbildung 5.5: Prinzip der Biomolekularen Interaktions-Analyse

5.7.11. Freisetzung von Glukose aus Acarbose

Mit Hilfe zellfreier Extrakte der Stämme *E. coli* HS3018, CB39 und TK38, präpariert nach EHRMANN & BOOS (1987), wurde die Aktivität der beiden Enzyme MalQ und MalZ in Anwesenheit von Acarbose analysiert. Die Zellen wurden wie unter 5.4.2 beschrieben in Vollmedium LB mit 0,2 % Maltose angezogen. Nach dem Zellaufschluss in 100 mM NaPO₄-Puffer und der Abtrennung des LSPs (s. 5.7.1) wurden die Extrakte über Nacht gegen 1000-faches Volumen 100 mM NaPO₄-Puffer dialysiert. In Messansätzen von 100 µl wurden je 60 µg Extrakt zusammen mit verschiedenen Mixturen an Maltose, Maltotetraose und Acarbose in unterschiedlichen Konzentrationen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurden durch zweiminütiges Kochen gestoppt. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 13 000g) wurde die im Überstand enthaltene Glukose mit Hilfe der GOD-POD-Methode quantifiziert (BERGMEYER, 1974).

5.7.12. Reinigung des AcbH-Proteins

Das Fusionsprotein (His)₁₀-AcbH wurde nach Überexpression des *acbH*-Gens von pCB10 in *E. coli* BL21(DE3)<pLysS> mit Harnstoff aus dem LSP solubilisiert und über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden die Zellen wie unter 5.4.2 beschrieben als Hauptkultur in Vollmedium LB mit den Antibiotika Amp und Cam angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₅₀ von 1 mit 0,1 mM IPTG. Nach drei Stunden wurde die Kultur geerntet und einem Zellaufschluss unterzogen (s. 5.7.1). Das LSP wurde abzentrifugiert, im selben Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert und zu 5 mg Protein mit 8 M Harnstoff (gelöst in Aufschlusspuffer) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken solubilisiert. Nach einer Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 200 000g wurde dann das Solubilisat mit 2 ml Ni-NTA-Matrix ebenfalls bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgten Waschungen

zunächst mit 10 ml reinem Harnstoffpuffer, dann mit zusätzlich 20 mM Imidazol. Schließlich wurde das Protein mit 4 ml 150 mM Imidazol in Harnstoffpuffer eluiert.

Für die Reinigung des (His)₁₀-AcbH nach Expression des *acbH*-Gens von pCB12 in *S. lividans* wurden die Zellen wie unter 5.4.2 beschreiben mit dem Antibiotikum Thiostrepton für zwei Tage angezogen. Der Säulenlauf mit 0,5 ml Ni-Matrix wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mit der nach Zellfraktionierung erhaltenen Cytosolfraktion (s. 5.7.1) analog dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Die Reinigung des (His)₆-MalE nach Überexpression des *malE*-Gens von pCB5 in *E. coli* JM109 wurde analog dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Zellen wuchsen in Vollmedium 2YT, der Säulenlauf wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mit der nach Zellfraktionierung erhaltenen Cytosolfraktion (s. 5.7.1) durchgeführt.

5.7.13. Renaturierung des AcbH-Proteins

Die Renaturierung des denaturierend gereinigten (His)₁₀-AcbH (s. 5.7.12) erfolgte mit Hilfe von Arginin über zwei hintereinander geschaltete Gelfiltrationen mittels PD10-Säulen (DE BERNARDEZ CLARK, 1998; MIDDELBERG, 2002). Im ersten Schritt wurde das nach der Reinigung in Harnstoffpuffer vorliegende Protein in 1 M Argininpuffer gemischt, auf eine PD10-Säule pipettiert und mit 1 M Argininpuffer wieder eluiert. In einem zweiten Schritt wurde das nun in Argininpuffer vorliegende AcbH direkt auf die nächste PD10-Säule gegeben und auf Eis mit einem Puffer aus 20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 5 % Glycerin und 300 mM NaCl eluiert. Nach einer Ultrazentrifugation bei 200 000g für 30 Minuten bei 4°C wurde das lösliche Protein sofort für die Zuckerbindungsstudien (s. 5.7.10) verwendet.

Die Renaturierung des denaturierend gereinigten (His)₆-AcbH erfolgte mit dem Renaturierungsreagenz Roti[®]-Fold (8x) nach Angabe des Herstellers (Firma ROTH). Alternativ sollte in einem Verfahren das Protein durch eine schnelle Dialyse gegen 1000-faches Volumen Puffer (50 mM Tris, pH7,2, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin) renaturiert werden. Die „Artificial Chaperon“-Methode wurde nach DAUGHERTY *ET AL.* (1998) durchgeführt.

5.7.14. CD-Spektrum des renaturierten Proteins AcbH

Der Nachweis einer α -helikalen Konformation des renaturierten Bindeproteins AcbH konnte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Margitta Dathe und Frau Nikolenko (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch) durch die Aufnahme eines CD-Spektrums erbracht werden. Darüber hinaus allerdings ließen sich anhand des Spektrogramms keine quantitativen Aussagen über die α -Helizität treffen, da bei den Messungen die Anwesenheit von Chlorid-Ionen störend war, das Protein aber nicht ohne NaCl bzw. alternativ mit NaF renaturiert werden konnte. Das Protein lag vor in 20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 5 % Glycerin, 150 mM NaCl₂, das Spektrum (260 nm bis 190 nm) wurde in dem Gerät Jasco 720 (Japan) aufgenommen.

5.7.15. Solubilisierung des WT-AcbH aus Membranen

Membranfraktionen von Zellen nach Anzucht in Minimalmedium mit 0,5 % Acarbose wurden zu 390 µg Proteinanteil in 300 µl Solubilisierungspuffer (1,1 % Dodecyl- β -D-maltosid (DDM), 5 % Glycerin, 0,1 mM PMSF in Minimalmedium) aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis gerührt und anschließend ultrazentrifugiert (200 000 g, 30 Minuten). Das Membranpellet wurde im Ausgangsvolumen Solubilisierungspuffer resuspendiert. Durch den Auftrag gleicher Volumina auf SDS-Gele konnte die Solubilisierungseffizienz nach Immunoblot-Analyse mit Anti-AcbH-Antiserum (s. 5.7.6) überprüft werden.

Für einen ersten Reinigungsversuch über Anionen-Austauschmatrix (DEAE-Sephrose) wurde das Solubilisat über Nacht gegen 2 Liter Säulenpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,01 % DDM) dialysiert und auf 0,5 ml DEAE-Sephrose-Matrix gegeben. Durch schrittweises Waschen mit steigenden NaCl-Konzentrationen sollte das Protein von der Matrix eluiert werden.

5.7.16. Reinigung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins aus dem Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp.

Die Reinigung des potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins erfolgte affinitätschromatographisch mittels Amylose-Matrix nach FERENCI & KLOTZ, 1978. Nach Anzucht von *Actinoplanes* sp. in Minimalmedium MNS mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (s. 5.4.2) wurden die Proteine aus dem Kulturüberstand in einer Amicon-Rührzelle (YM10-Filter, s. 5.1) bei einem Druck von 1 bar ankonzentriert. Nach Erreichen von ca. 1/50 des Ausgangsvolumens wurde der Druck wieder abgebaut und das Rühren für weitere 30 Minuten fortgesetzt, um Protein vom Filter zu lösen. Anschließend folgte eine Dialyse über Gelfiltration mittels PD10-Säulen gegen 25 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1mM CaCl₂ und die Probe wurde auf eine Amylose-Säule (0,5 ml Bed) pipettiert. Nach Waschungen mit sechs Säulenvolumen Puffer wurde das Protein mit 20 mM Maltose oder Maltodextrinen eluiert.

Analog wurde mit dem MalE von *E. coli* nach Überexpression des Gens von pCB5 verfahren, die Cytosolfraktion wurde über Nacht gegen 2000-faches Volumen 50 mM Tris/HCL, pH 7,2 dialysiert. Die Zellanzucht erfolgte wie unter 5.7.12 beschrieben.

Analog wurde auch mit dem (His)₁₀-AcbH nach Expression des Gens von pCB12 in *S. lividans* verfahren. Die Zellanzucht und Fraktionierung erfolgte wie unter 5.7.12 beschrieben, die Cytosolfraktion wurde über Nacht gegen 2000-faches Volumen 50 mM Tris/HCL, pH 7,2 dialysiert.

5.7.17. Massenanalyse und Peptidsequenzierung

Das im Kulturüberstand gefundene, potentielle Maltose/Maltodextrin-Bindeprotein wurde einer MALDI-TOF MS-Analyse (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization-**T**ime **O**f **F**light **M**assen **S**pektrometrie) unterzogen. Die Arbeiten hierzu wurden freundlicherweise überwiegend von Frau Dr. Sophie Haebel (Max Planck Institut, Potsdam) übernommen. Die Sequenzen einzelner Peptide sind im Anhang aufgelistet.

Außerdem konnte das von pCB7 synthetisierte Protein, welches für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung eines Anti-AcbH-Antiserums verwendet wurde (s. auch 5.7.5), durch MALDI-TOF-Analyse als AcbH bestätigt werden.

Das Protein wurde in der ausgeschnittenen, Coomassie gefärbten Gelbande nach Entfärbung in einem Mix aus 40% Acetonitril und 60% 50 mM NH₄HCO₃ und Trocknung durch Vakuumzentrifugation über Nacht bei 37°C mit Trypsin verdaut (30 ng/μl in 50 mM NH₄HCO₃). Dann wurden die Peptide durch Zugabe von 30 μl 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) und zehn Minuten später 50 μl Acetonitril aus den Gelfragmenten extrahiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach einer zweiten Extraktion wurden die Überstände vereinigt und lyophilisiert.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Reflex II MALDI-TOF Instrument (Bruker-Daltonik, Bremen) aufgenommen. Alle Spektren wurden im Reflektormodus mit α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (15 mg/ml in 60 % Acetonitril/40 % flüssiger TFA (0,1 % v/v) als Matrix aufgenommen.

Das Peptidgemisch wurde mit RP-HPLC (**R**eversed **P**hase **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, SMART System, Pharmacia, Uppsala, Schweden) über eine Pharmacia C2/C18 SC 2.1/10-Säule in einem linearen Acetonitril-Gradienten (0 – 50 % in 0,1 % TFA in 50 Minuten) getrennt. Bei einer Fußrate von 100 μl/Minute wurden die Peptide bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert. Die Fraktionen wurden manuell aufgefangen. Peptidhaltige Fraktionen wurden mit nano-ESI (Elektrospray-Ionisierung) analysiert und MS/MS Spektren wurden auf einem API QSTAR Pulsar I LC/MS/MS Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems/MDS Sciex (Toronto, Kanada) aufgenommen. Die MS/MS Spektren lieferten die partielle oder vollständige Sequenzinformation der analysierten Peptide.

6. ERGEBNISSE

6.1 Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von *Escherichia coli* K12

Das von STRATMANN (1997) aufgestellte Modell des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. beschreibt neben einer Carbophor-Funktion der Acarbose auch die Rolle dieses Moleküls als Inhibitor von α -Amylasen und α -Glukosidasen von Nahrungskonkurrenten im Habitat. Vor diesem Hintergrund und der strukturellen Ähnlichkeit des Pseudotetrasaccharids Acarbose zu Maltotetraose (vgl. Seite 10, Abbildung 4.1) wurde der Einfluss von Acarbose auf den Maltose- und Maltodextrinstoffwechsel von *E. coli* K12, der durch Maltotriose induziert wird, untersucht (s. Abschnitt 4.2.4). Im Rahmen einer Diplomarbeit (BRUNKHORST, 1998) konnte bereits dokumentiert werden, dass Acarbose spezifisch sowohl das Wachstum von *E. coli* K12 mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle als auch den Maltoseimport über das Bindeprotein-abhängige ABC-Transportsystem MalEFGK₂ hemmt (s. auch Abbildung 6.1). Wachstum der Zellen mit Acarbose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle war nicht möglich, darüber hinaus wurde aber bei Ko-Kultivierung von *E. coli* K12 mit Glycerin und Acarbose in Immunoblot-Analysen eine erhöhte Synthese des Maltose-Bindeproteins MalE festgestellt. Da auch das Wachstum einer Bindeprotein-unabhängigen Mutante (s. Abschnitt 4.2.3.1; *malF500*, TREPTOW & SHUMAN, 1985) auf Maltose durch Acarbose beeinträchtigt war, wurde spekuliert, dass Acarbose von individuellen Komponenten des Maltose- und Maltodextrinstoffwechsels als Substrat erkannt wird.

In weitergehenden Untersuchungen wurde daher zu Beginn der vorliegenden Arbeit zunächst das Vermögen von *Escherichia coli* K12, [¹⁴C]-Acarbose zu importieren, überprüft. Außerdem wurden die Interaktion von Acarbose mit dem Maltose-Bindeprotein MalE und der Einfluss des Pseudozuckers auf den Maltose-Katabolismus mit Blick auf die intrazellulären Enzyme MalQ und MalZ differenziert.

6.1.1. Acarboseaufnahme in Zellen von *Escherichia coli* K12

Um zu überprüfen, ob Zellen von *E. coli* K12 die Kapazität besitzen, über das Maltose- und Maltodextrintransportsystem MalEFGK₂ auch das Pseudotetrasaccharid Acarbose zu importieren, wurden vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme von [U-¹⁴C]-Maltose bzw.

[^{14}C]-Acarbose (je 5,7 μM und 300 nCi, im Falle der radioaktiven Acarbose waren lediglich die C-Atome des Acarviosyl-Restes durch das ^{14}C -Isotop ersetzt) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in Minimalmedium M63 mit 0,5 % Maltose kultiviert und, wie unter 5.7.7 beschrieben, für die Messungen vorbereitet. Die Spezifität des jeweiligen Transportprozesses wurde in solchen Ansätzen verglichen, in denen die Zellen vor dem Reaktionsstart durch Zugabe der radioaktiven Zuckerlösung mit einem Überschuss des entsprechenden Strukturhomologen (0,1 mM) inkubiert worden waren. Die gewonnenen Werte (Abbildung 6.1) wurden jeweils auf 10^9 Zellen/min berechnet und gemittelt.

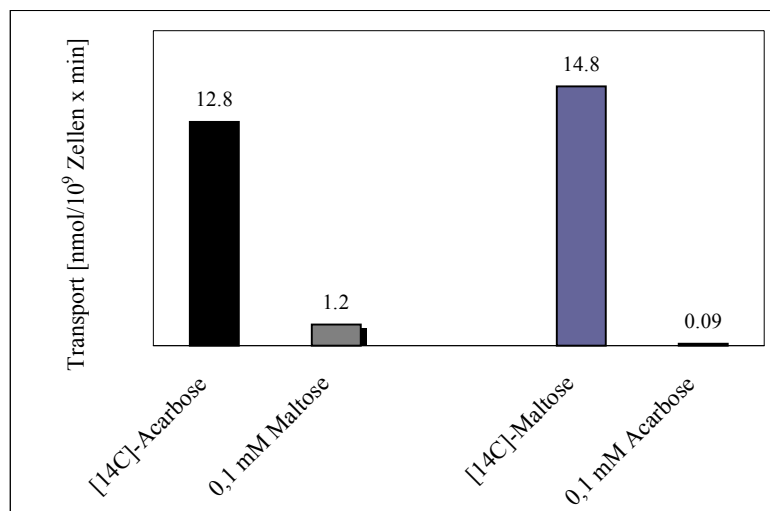


Abbildung 6.1: Aufnahme von Acarbose über das Maltosetransportsystem von *E. coli* K12. Die Zellen wurden in Minimalmedium M63 mit 0,5 % Maltose kultiviert und bei Erreichen der spät exponentiellen Wachstumsphase für die Messungen vorbereitet. Die Konzentration der radioaktiven Zuckerlösungen betrug 5,7 μM . Zur Überprüfung der Spezifität wurde den Ansätzen in einer anderen Messung zusätzlich je 0,1 mM des Strukturhomologen zugegeben.

Über den gesamten Messzeitraum von 40 Sekunden war eine Linearität des Transports gegeben. Der Acarboseimport wurde mit einer dem Maltosetransport ähnlichen Rate realisiert und in Gegenwart von Maltose kompetitiv auf 10 % reduziert. Zusammen mit dem Befund, dass Zellen aus Anzuchten mit Glycerin keine Acarbose-Transportaktivität aufwiesen (nicht gezeigt), lässt sich konstatieren, dass Acarbose über das ABC-System MalEFGK₂ von *E. coli* transportiert wird.

Das bei Ko-Kultivierung von *E. coli* K12 mit je 0,5 % Glycerin und Acarbose durch Immunoblot-Analysen nachgewiesene erhöhte Syntheseelevel des Maltose-Bindeproteins (BRUNKHORST, 1998) wurde mit Zellen solcher Anzuchten in weiteren Transportexperimenten näher untersucht. Im Gegensatz zu Kontrollzellen, die mit 0,5 %

Maltose angezogen wurden, konnte jedoch weder Maltose- noch Acarbose-Transportaktivität beobachtet werden (nicht gezeigt).

6.1.2. Interaktion von Acarbose mit dem Maltose-Bindeprotein MalE

Die Differenzierung der Interaktion von Acarbose mit einzelnen Komponenten des Maltose und Maltodextrinstoffwechsels von *E. coli* K12 wurde zunächst in Konkurrenzexperimenten mit MalE und gleichzeitiger Anwesenheit von Maltose und steigenden Acarbose-Konzentrationen vorgenommen (s. 5.7.9). Dafür wurde die Periplasmafraktion von Zellen aus Anzuchten in Minimalmedium M63 mit 0,5 % Maltose präpariert (s. 5.7.2). Ein MalE-freier Osmoschock-Überstand wurde durch Kultivierung der Zellen mit 0,5 % Glukose gewonnen und ebenfalls in die Messungen eingesetzt. In Abbildung 6.2 sind die gemittelten Daten einer Doppelbestimmung zusammengefasst und in Prozent des Kontrollwertes angegeben.

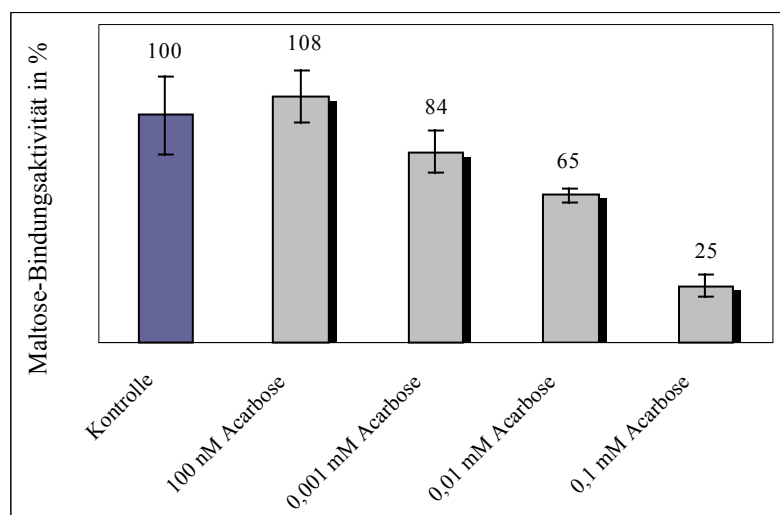


Abbildung 6.2: Einfluss von Acarbose auf die Bindung von Maltose an MalE von *E. coli* K12. Von den periplasmatischen Fraktionen wurden je 120 µg Gesamtprotein für die Studien eingesetzt, daran anteilig war MalE mit ca. 5 %. Mit Ausnahme der Kontrolle wurden die einzelnen Messansätze für eine Minute mit verschiedenen Acarbose-Konzentrationen vorinkubiert und dann erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von [U-¹⁴C]-Maltose. Die ohne zusätzliche Acarbose im Messansatz erreichte Bindung von radioaktiv markierter [U-¹⁴C]-Maltose (5 µM, 300 nCi) an das Protein MalE betrug 2,6 nmol/120 µg Gesamtprotein (= 100 %).

Die Abbildung 6.2 stellt die Interaktion von Acarbose mit dem Maltose-Bindeprotein von *E. coli* deutlich dar. Bereits in Gegenwart von 0,001 mM Acarbose wurde die Maltose-Bindeaktivität des Proteins zu 16 % gehemmt. Noch höhere Acarbose-Konzentrationen resultierten in Restaktivitäten von nur noch 25 % (0,1 mM Acarbose, vgl. Abbildung 6.1). Die

Inhibition der Bindung von 5 μM [^{14}C]-Maltose war halb-maximal bei einer Acarbose-Konzentration von 17 μM (nicht gezeigt).

Bei Verwendung des MalE-freien Osmoschock-Überstandes wurde keine Maltose-Bindeaktivität beobachtet.

6.1.3. Acarbose als Substrat der cytoplasmatischen Enzyme MalQ und MalZ

Aufgrund der bisher beschriebenen Befunde zum Einfluss von Acarbose auf den Maltose- und Maltodextrinstoffwechsel von *E. coli* sollte abschließend überprüft werden, inwieweit die importierte Acarbose im Cytoplasma enzymatisch verwertet wird. Unter Verwendung von Ganzzellextrakten der Stämme HS3018, der die *mal*-Gene konstitutiv exprimiert, und TK38 (*malQ⁺ malZ*) bzw. CB39 (*malQ malZ⁺*) wurde bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen und Kombinationen an Maltotetraose, Maltose und Acarbose die Menge freigesetzter Glukose quantifiziert (s. 5.7.11; s. auch 4.2.3.1 und Seite 89, Abbildung 7.1).

Aus Abbildung 6.3A ist zunächst ersichtlich, dass Acarbose kein gutes Substrat der Maltodextrin-metabolisierenden Enzyme Amylomaltase MalQ und Maltodextrin-Glukosidase MalZ ist. Im Vergleich zur Freisetzung von Glukose aus Maltotetraose (Spur 1) entstanden aus Acarbose lediglich 3 % freie Glukose (Spur 2). Darüber hinaus wirkt Acarbose nur als schwacher Inhibitor von MalQ und MalZ, denn die Verwertung von Maltotetraose (10 mM) in Gegenwart von 1 mM Acarbose war kaum beeinträchtigt (Spur 3). Die Spuren 6 und 7 beschreiben, da MalQ als Glykosyldonor Maltotriose oder höhere Homologe benötigt, dass Acarbose bei Anwesenheit von Maltose (mit 10 mM im Überschuss) als solch ein Glykosyldonor (0,5 μmol freie Glukose/mg Protein), aber kaum als Akzeptor genutzt wurde. Betrachtet man das gleiche Experiment unter Verwendung eines Ganzzellextraktes des Stammes CB39 (Abbildung 6.3B), bestätigt sich Acarbose als schwaches Substrat der Maltodextrin-Glukosidase. Verglichen mit der Glukosefreisetzung aus Maltotetraose (Spur 1) wurden aus Acarbose nur ca. 30 % Glukose abgespalten (Spuren 2 und 7). Die Hemmung von MalZ durch Acarbose betrug bei verbleibender Restaktivität von 0,24 μmol /mg Protein 40 % (Spur 3).

Für die Aktivität der Amylomaltase (Abbildung 6.3C) gilt ebenso die Eigenschaft der Acarbose als schwacher Inhibitor der Freisetzung von Glukose aus Maltotetraose mit Maltose als Maltotriosyl-Akzeptor (vgl. Spuren 4 und 5), nicht jedoch die als Substrat (Spuren 2 und 7).

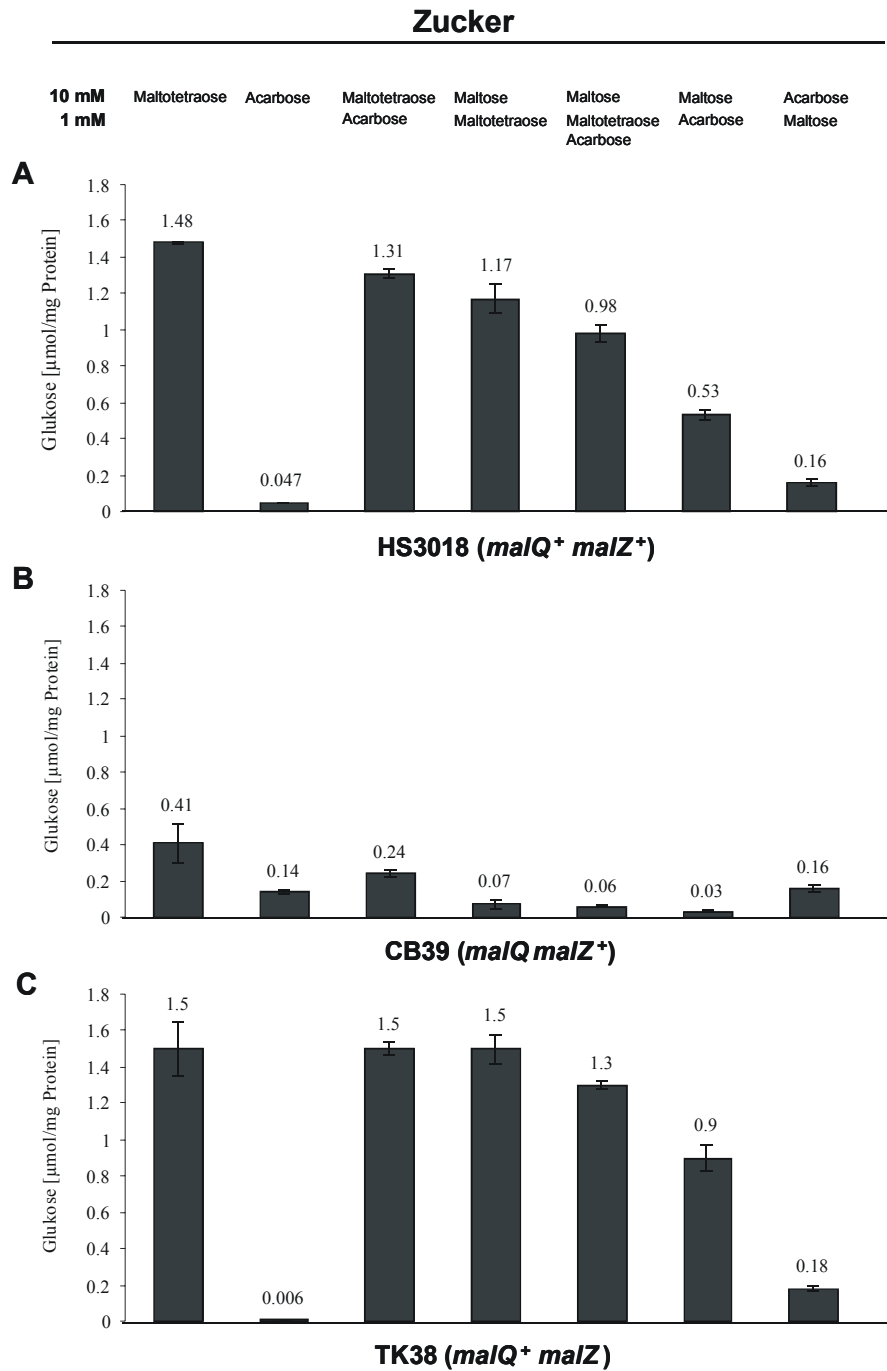


Abbildung 6.3: Freisetzung von Glukose durch die Amylomaltase MalQ und die Maltodextrin-Glukosidase MalZ in Gegenwart von Acarbose. Die Menge an freier Glukose wurde mit der GOD-POD-Methode quantifiziert (BERGMEYER, 1974).

Zusammenfassend geben diese Ergebnisse an, dass Acarbose in *E. coli* K12 intrazellulär akkumuliert wird und wahrscheinlich aufgrund eines resultierenden toxischen Effektes das Wachstum der Zellen bis hin zur Lyse beeinträchtigt.

6.2 Untersuchungen zur Transportkapazität von *Actinoplanes* sp.

Actinoplanes sp. steht als Acarbose-Produzent und Angehöriger der großen Gruppe der Actinomyceten, die sich durch die Synthese verschiedenster Sekundärmetabolite mit medizinischer und ökonomischer Bedeutung auszeichnen, in besonderem wissenschaftlichen Interesse. Sekundärmetabolismus arrangiert sich auf der Basis von Vorstufen aus dem Primärmetabolismus. Ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis der Entstehung von sekundären Metaboliten ist daher die Aufklärung des primären Metabolismus dieser Organismen.

Bereits 1979 wurde von PARENTI & CORONELLI für verschiedene Arten der Bakteriengattung *Actinoplanes* eine Beteiligung am Abbau pflanzlicher Pentosane vorgeschlagen, da Xylose und Arabinose gute Substrate darstellen. Weiterhin bekannt als Kohlenstoffquellen waren z. B. Glukose, Fruktose, Saccharose, für einige Spezies auch Laktose und nur für zwei Arten Cellulose (VOBIS, 1989).

Mit dem Ziel der Optimierung der Acarbosefermentation liegen nun seit einigen Jahren die Schwerpunkte zu Arbeiten mit *Actinoplanes* sp. auf einer detaillierten Charakterisierung der Biosynthese des Sekundärmetaboliten Acarbose und seiner Funktion. Im Rahmen dieser Studien sind als nutzbare Kohlenstoffquellen Glukose, Maltose so wie Maltotriose und auch höhere Homologe bekannt geworden (STRATMANN, 1997, WEHMEIER, 2003). Zu Beginn dieser Arbeit lagen darüber hinausreichende Erkenntnisse zum Substratimport so wie zur Nutzung weiterer Zuckersubstrate als Kohlenstoff- und Energiequelle im primären Metabolismus von *Actinoplanes* sp. nicht vor.

Das dieser Arbeit zu Grunde liegende Modell des Acarbose-Metabolismus (STRATMANN, 1997; WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004; s. Seite 11, Abbildung 4.2) involviert sowohl einen extrazellulären Stärke/Maltodextrin-Stoffwechsel wie auch einen intrazellulären Maltodextrin/Maltose-Stoffwechsel. Postuliert sind dazugehörige Importsysteme für die entsprechenden Substrate, darunter das Bindeprotein-abhängige ABC-System AcbHFG.

Um nun diesen Substratimport zu belegen, des weiteren Hinweise auf Transport- so wie Regulationsmechanismen zu erhalten und Einblicke in die Nutzung von Zuckern durch *Actinoplanes* sp. zu gewinnen, wurden verschiedene *in vivo* Experimente zur Aufnahme von radioaktiv markierter Maltose und Maltotriose (je 51 μ M) und Acarbose (5,7 μ M) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit diesen und alternativen Kohlenstoffquellen kultiviert. Das Wachstumsverhalten dieser Kulturen wurde untersucht und für die

Transportmessungen wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt. Diese dargestellten Experimente wurden fast ausschließlich mit dem Stamm 223/29 durchgeführt. Die Ergebnisse, die in den Abbildungen 6.4-6.10 gezeigt sind, konnten in Stichproben mit Zellen des Stammes 50/110 bestätigt werden.

6.2.1 Wachstum von *Actinoplanes* sp. 223/29 mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Die Kulturen wurden, wie unter 5.4.2 beschrieben, über einen Zeitraum von 72 Stunden mit verschiedenen Zuckern als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen. Die Wachstumskurven, in Abbildung 6.4 dargestellt, wurden über die Bestimmung des Proteingehaltes ganzer Zellen (s. 5.7.3) aufgestellt. Die Daten begründen sich als Mittelwerte auf jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

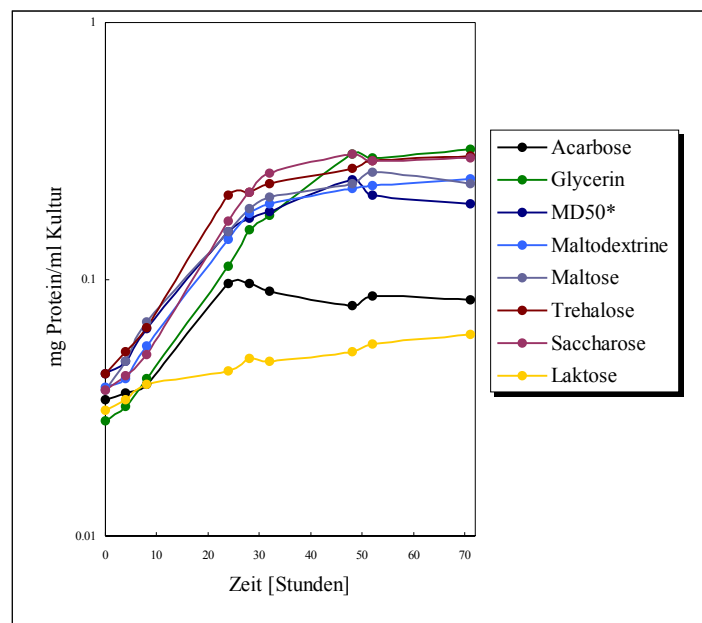


Abbildung 6.4: Wachstum des Stammes *Actinoplanes* sp. 223/29 mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Zellen wurden in Minimalmedium MNS mit den in der Legende angegebenen C-Quellen zu je 0,5 % über einen Zeitraum von drei Tagen angezogen.

Die Abbildung 6.4 zeigt einheitliches Wachstum der Zellen in statischer Kultur mit so unterschiedlichen Substraten wie Glycerin, Trehalose, Saccharose und Maltooligosacchariden. Bei einer Verdopplungszeit von ca. zehn Stunden erreichten die Zellen nach etwa 28 – 30 Stunden (mit Trehalose nach 24 Stunden) jeweils die stationäre Phase.

* MD50 ist ein Gemisch aus Maltose und Maltotriose und zu 7 % Bestandteil des von STRATMANN (1997) zusammengestellten Acarbose-Produktions-Mediums. Es enthält auch Spuren von höheren Homologen.

Mit einer verringerten Verdopplungszeit von ungefähr 17 Stunden wuchsen die Zellen außerdem auf Acarbose, nach 24 Stunden war aber ein abrupter Stillstand des Zellwachstums zu beobachten. Von den überprüften Kohlenstoffquellen konnte lediglich für Laktose kaum Wachstum festgestellt werden.

Ebenfalls als gute Substrate dienten Xylose, Haferspелzen- und besser Birkenholzxytan (eigene Beobachtung). Dieses Resultat unterstützt eine den Genen *asp3.1* und *asp3.2* aus dem *acb*-Gencluster zugesprochene Funktion im Xylanabbau (M. Jarling, pers. Mitteilung). Von STOLPE konnten 2001 Enzyme eines Trehalose-Metabolismus identifiziert werden

6.2.2 Maltoseaufnahme in Zellen von *Actinoplanes* sp. 223/29

Actinoplanes sp. ist in der Lage, auf verschiedenen Zuckern als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (s. Abbildung 6.4). Dem Modell des Acarbose-Metabolismus folgend sollte der Maltoseimport in intakte Zellen von *Actinoplanes* sp. nachgewiesen und in einen Zusammenhang mit dem Wachstumssubstrat gebracht werden. Dafür wurden Kulturen, die in Minimalmedium mit sämtlichen dieser getesteten Zucker so wie zusätzlich Glukose und auch in Vollmedium TSB so wie Acarbose-Produktions-Medium angezogen wurden, in den Transportmessungen eingesetzt.

Die Experimente zur Aufnahme von Maltose wurden mit Zellen durchgeführt, die aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (nach 24 Stunden) entnommen wurden. Die Vorbereitung der Zellen und die Transportmessungen erfolgten wie unter 5.7.7 beschrieben.

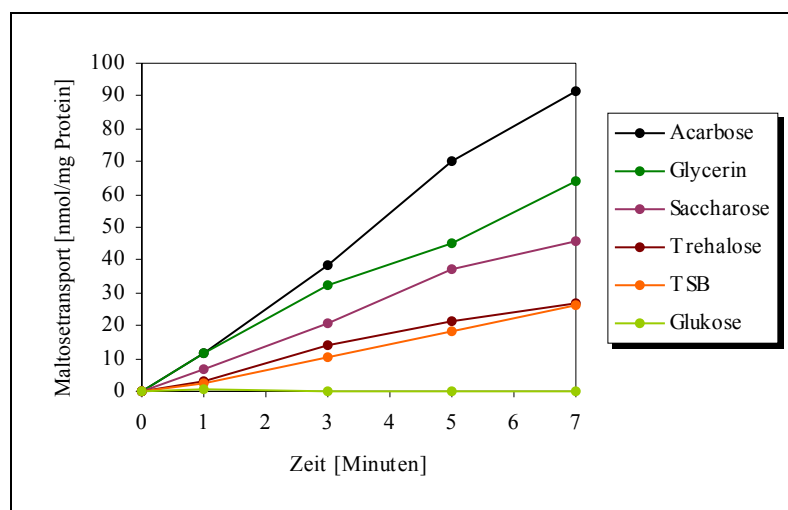


Abbildung 6.5: Aufnahme von Maltose in Zellen des Stammes *Actinoplanes* sp. 223/29 – Darstellung der Linearität. Die Zellen wurden Vollmedium TSB und Minimalmedium MNS mit den in der Legende angegebenen Zuckern zu je 0,5 % angezogen und nach 24 Stunden Wachstum für die Messungen entnommen.

Zu Beginn der Illustration der erzielten Ergebnisse soll die Abbildung 6.5 anhand einiger Transportexperiment repräsentieren, dass über den gesamten Messzeitraum von sieben Minuten eine Linearität des Transports gegeben war.

Hier ist bereits zu sehen, dass die Aufnahme radioaktiv markierter Maltose (51 μM) in Zellen fast aller Kulturen, unabhängig von der C-Quelle, prinzipiell nachgewiesen werden konnte. Lediglich Wachstum mit Glukose erlaubte kaum einen Import dieses Zuckers.

Die folgende Abbildung 6.6 ist eine Zusammenfassung sämtlicher Transportdaten aus bis zu 11 unabhängigen Messungen (vgl. auch Abbildung 6.9). Für diese Darstellung wurden alle gewonnenen Werte jeweils auf mg Protein/min bezogen und anschließend gemittelt.

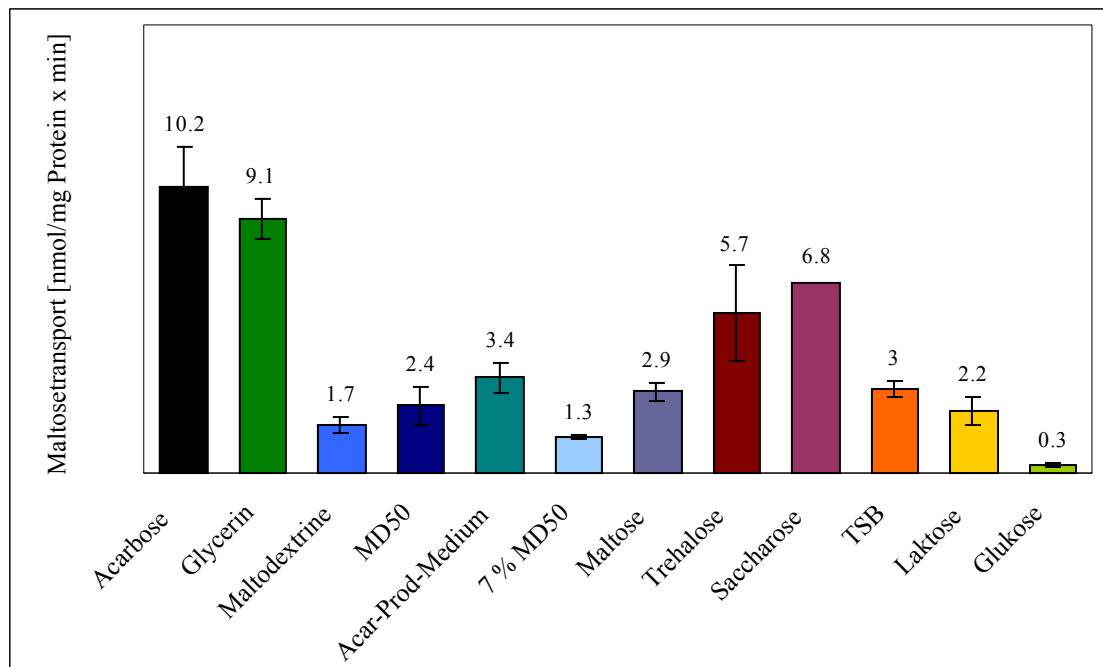


Abbildung 6.6: Durchschnittliche Maltoseaufnahme in Zellen von *Actinoplanes* sp. 223/29. Die Zellen wurden in Acarbose-Produktions-Medium, Vollmedium TSB bzw. Minimalmedium MNS mit den angegebenen Zuckern zu je 0,5 % bzw. 7 % MD50 kultiviert und nach 24 Stunden Wachstum für die Transportmessungen eingesetzt.

Es zeigten sich Unterschiede im Maltosetransport hinsichtlich der verwendeten Kohlenstoffquelle bei Anzucht der Zellen. Die Transportaktivität wurde also abhängig vom Wachstumszucker unterschiedlich reguliert. So erreichten Zellen aus Acarbose- bzw. Glycerinkulturen deutlich die höchsten Raten. Hingegen resultierte Wachstum in sämtlichen Maltose- und Maltodextrin-haltigen Medien so wie in Laktose und TSB (enthält herstellungsbedingt Glukose und Maltose, Firma OXOID) in den niedrigsten Transportaktivitäten.

Die Transportraten von TSB-Zellen lassen vermuten, dass die Mechanismen einer Glukoserepression nicht nach dem Prinzip des Induktorausschlusses bei Enterobakterien wie *E. coli* oder einer CcpA vermittelten Repression kataboler Operone bei grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wie *B. subtilis* (Übersicht: STÜLKE & HILLEN, 1999) funktionieren (s. Abschnitt 4.2.4).

6.2.2.1. Spezifität der beobachteten Maltosetransport-Aktivitäten

Ausgehend von den obigen Befunden wurden die für den Acarbose-Metabolismus wesentlichen Kohlenstoffquellen Acarbose und MD50 ausgewählt, um im weiteren Verlauf der Charakterisierung des Maltosetransports die Substratspezifität des bzw. der beteiligten Maltosetransporter(s) zu ermitteln. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit den genannten Zuckern kultiviert, für die Transportmessungen vorbereitet und vor Zugabe der radioaktiven Maltose (51 μ M) mit einem Überschuss an verschiedenen Zuckern (1 mM) inkubiert (s. 5.7.7). Für die Abbildung 6.7 wurden neun (Acarbose-Zellen) bzw. fünf (MD50-Zellen) unabhängig durchgeführte Hemmstudien zusammengefasst. Alle gewonnenen Werte wurden jeweils auf mg Protein/min berechnet und gemittelt und dann in Prozent des Kontrollwertes angegeben.

Die Inkubation der Zellen von *Actinoplanes* sp. mit einem Überschuss an Maltodextrinen, Trehalose und Saccharose resultierte, unabhängig vom Wachstumssubstrat, in einer drastischen Hemmung des Maltosetransports. Dieses Resultat wurde bei Zellen aus Anzuchten mit Maltose und Maltodextrinen MD ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Auffällig war, dass bei Acarbose-Zellen die Restaktivität in Gegenwart von Maltodextrinen ungefähr doppelt so hoch lag wie in Gegenwart von Trehalose und Saccharose (28 % im Vergleich zu 13 %), während diese multiple Hemmung bei MD50-Zellen keine Unterschiede zeigte und mindestens noch 21 % Restaktivität erlaubte. Deutlich war weiterhin die 41 bzw. 34 %ige Inhibierung durch Glukose. Dagegen wurde die Maltoseaufnahme kaum durch Laktose und nur bei MD50-Zellen durch Acarbose (unter Beachtung der Schwankungen konstatiert) beeinflusst (vgl. auch Abbildung 6.10).

Mit Ausnahme des Acarbose-Effektes waren die Hemmmuster insgesamt ähnlich, unterschieden sich aber im Hinblick auf die Wirkungen von Trehalose, Saccharose und Maltodextrinen im Ausmaß der Inhibition. Bei Acarbose-Zellen gar gleich im Falle von Trehalose und Saccharose die Hemmung dem Ausverdünnungseffekt durch kalte Maltose als

Ausdruck einer gleichwertigen Konkurrenz dieser drei Zucker um den Transport. So könnten dieses unterschiedliche Ausmaß der Inhibition und der Acarbose-Effekt zwei Hinweise darauf sein, dass die Maltosetransportaktivität von Zellen aus Acarbose- und MD50-Kulturen von verschiedenen Transportsystemen realisiert wird.

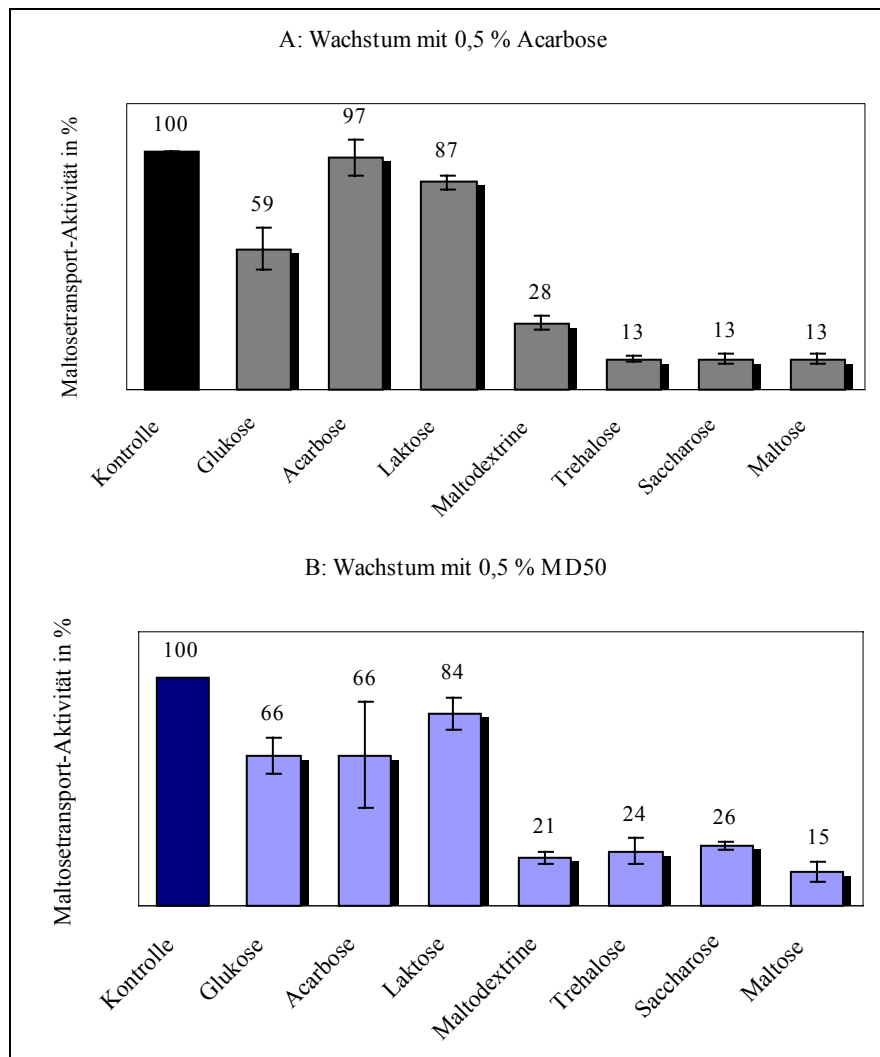


Abbildung 6.7: Inhibition der Maltoseaufnahme durch verschiedene Zucker. Die Zellen wurden in Minimalmedium MNS mit je 0,5 % Acarbose (A) bzw. MD50 (B) kultiviert und nach 24 Stunden Wachstum für die Hemmstudien eingesetzt. Die Zucker, deren Einfluss auf den Transport überprüft werden sollte, sind jeweils rechts neben den Kontrollen (= 100 %) aufgeführt. Kontrollwerte sind die ohne zusätzlichen Zucker im Messansatz erreichten Transportraten. Sie lagen im Falle der Zellen, die mit Acarbose gewachsen waren, bei 11,1 nmol Maltose/mg Protein x min und bei solchen, die mit MD50 angezogen wurden, bei 2,3 nmol Maltose/mg Protein x min.

6.2.2.2. Transportkinetik

Bei grampositiven Bakterien wurden verschiedene Energie-abhängige Mechanismen für den Transport von Maltose identifiziert. Zum Beispiel wird bei *Bacillus licheniformis* Maltose über einen Protonensymporter in die Zelle aufgenommen (TANGNEY *ET AL.*, 1992; TANGNEY *ET AL.*, 1998), bei *Streptococcus bovis* hingegen über ein Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängiges Phosphotransferasesystem (PTS) (MARTIN & RUSSELL, 1987). Bakterien wie *Streptomyces lividans* oder *Alicyclobacillus acidocaldarius* wiederum nutzen für die Translokation von Maltose Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1997; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000; SCHEFFEL *ET AL.*, 2004).

Diese nach verschiedenen Mechanismen funktionierenden Transportsysteme differenzieren sich anhand der jeweils charakteristischen kinetischen Parameter. So lassen sich ganz klar die primären von den sekundären Transportern abgrenzen. K_m -Werte von ABC-Systemen oder Phosphotransferasesystemen liegen im Bereich von 0,1 bis 10 μM , während Protonensymporter deutlich niedrigere Substrataffinitäten aufweisen (10-100-fach) (LENGELER, 1993).

Um Hinweise auf den Mechanismus des Maltoseimports zu erhalten und im weiteren zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Transportraten eventuell auf Systeme mit verschiedenen Affinitäten zurückzuführen sind, wurde der Maltosetransport von Zellen aus Anzuchten in Minimalmedium mit je 0,5 % Acarbose, Glycerin, MD50 und Maltose hinsichtlich seiner kinetischen Parameter K_m und V_{\max} charakterisiert. Dazu wurden die Transportraten bei verschiedenen Substratkonzentrationen (1 – 61 μM Maltose) in jeweils zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten gemessen und gemittelt.

Beispielhaft sind in einem V/S-Diagramm in Abbildung 6.8A die Transportwerte von mit Maltose kultivierten Zellen dargestellt. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter des Transports wurden die Werte der einzelnen Messungen jeweils in einem Lineweaver-Burk-Diagramm analysiert (Abbildung 6.8B für Maltose-Zellen) und in der Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Die Transportkinetiken zeigten geringe, aber deutliche Unterschiede. Festzustellen ist, dass bei Glycerin-kultivierten Zellen der Maltosetransport mit höchster Substrataffinität, aber relativ langsam stattfand. Ähnlich schwach aktive Systeme hatten auch Zellen aus MD50 bzw. Maltose-Kulturen. Hingegen transportierten Zellen einer Acarbose-Kultur mit der höchsten Geschwindigkeit, jedoch weniger affin. Die niedrigste Affinität zu Maltose wies das

Transportsystem von MD50-kultivierten Zellen. Der K_m lag zehn- bzw. dreifach höher als der von Glycerin- bzw. Acarbose-Kulturen.

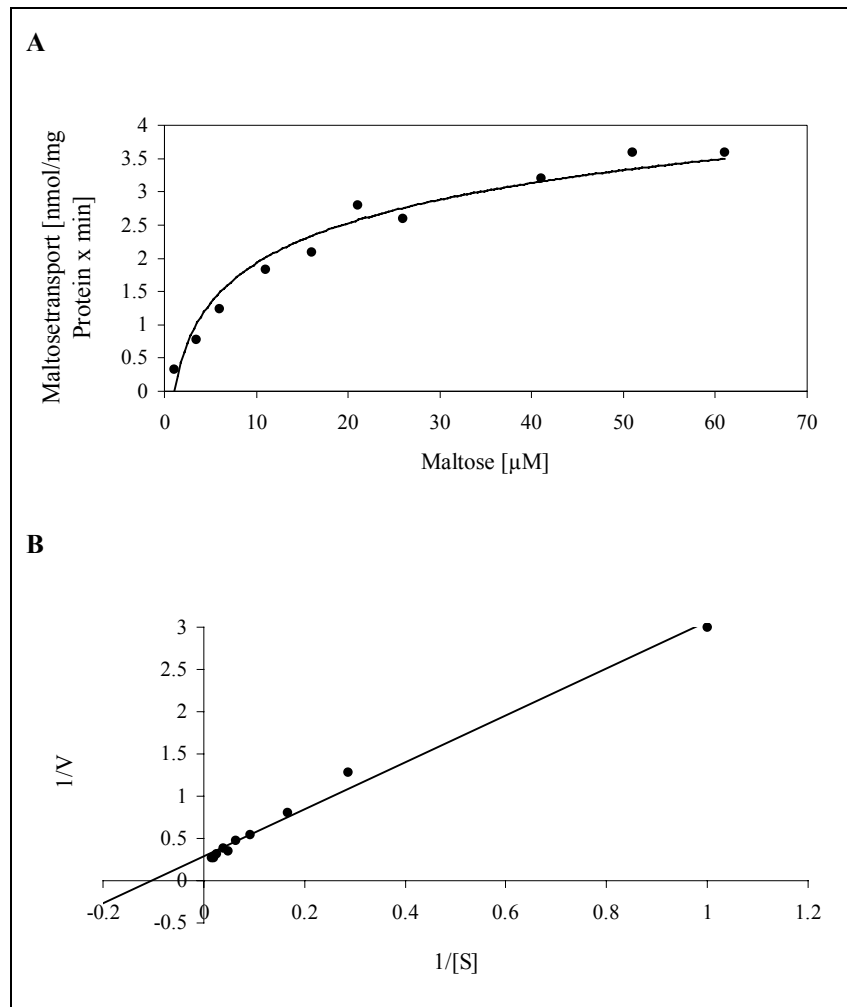


Abbildung 6.8: Bestimmung der kinetischen Parameter des Maltosetransports. Die Zellen wurden in Minimalmedium MNS mit 0,5 % Maltose kultiviert und nach 24 Stunden Wachstum für die Messung eingesetzt. A: V/S-Diagramm, B: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Tabelle 6.1: Kinetische Parameter des Maltosetransports bei *Actinoplanes* sp. 223/29

Medium	0,5 % Acarbose	0,5 % Glycerin	0,5 % MD50	0,5 % Maltose
MNS mit je				
K_m (μM)	11,7	3,0	33,3	9,7
V_{max} (nmol/mg x min)	17,9	6,0	3,4	3,5

Insgesamt sprechen die kinetischen Daten in allen vier Fällen für den Import von Maltose über einen primären Carrier. Durch Experimente zur Phosphorylierung von radioaktiver Maltose mit PEP in zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. konnte keine Aktivität eines PTS nachgewiesen werden (s. 5.7.8). So ist die Annahme vertretbar, dass die Maltoseaufnahme über einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportmechanismus realisiert wird.

6.2.3 Maltotrioseaufnahme in Zellen von *Actinoplanes* sp. 223/29

Dem Modell des Acarbose-Metabolismus und der Feststellung, dass der Maltosetransport in Zellen von *Actinoplanes* sp. neben anderen Zuckern auch durch Maltodextrine stark gehemmt wurde, folgend (s. Abbildung 6.7), sollte auch der Maltotrioseimport in intakte Zellen von *Actinoplanes* sp. untersucht werden. Dabei wurden in Anlehnung an die erzielten Daten des Maltosetransports signifikante Experimente ausgewählt, um die *in vivo* Studien abschließend zu festigen.

So sollte die Maltotrioseaufnahme zunächst in einen Zusammenhang mit dem Wachstumssubstrat gebracht werden. Dafür wurden Kulturen, die mit einer Auswahl der bereits für die Maltosetransport-Messungen verwendeten Kohlenstoffquellen angezogen wurden, in den Maltotrioseimport-Messungen eingesetzt. Die Zellen wurden aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (nach 24 Stunden) entnommen und, wie unter 5.7.7 beschrieben, für die Messungen vorbereitet. Die Abbildung 6.9 ist eine Zusammenfassung sämtlicher Transportdaten aus bis zu 8 unabhängigen Messungen. Für diese Darstellung wurden alle gewonnenen Werte jeweils auf mg Protein/min bezogen und anschließend gemittelt.

Prinzipiell war der Maltotrioseimport ähnlich dem Maltosetransport (vgl. Abbildung 6.6). Die Aufnahme radioaktiv markierter Maltotriose (51 μ M) konnte in Zellen fast aller Kulturen, unabhängig von der C-Quelle, prinzipiell nachgewiesen werden. Lediglich Wachstum mit Glukose erlaubte auch hier kaum einen Import dieses Zuckers.

Es zeigten sich Unterschiede im Maltotrioseimport hinsichtlich der verwendeten Kohlenstoffquelle bei Anzucht der Zellen. Die Transportaktivität wurde also ebenfalls abhängig vom Wachstumszucker unterschiedlich reguliert. So erreichten wieder deutlich die höchsten Raten Zellen aus Acarbose-Kulturen, die Raten für Maltotrioseimport von Glycerin-Kulturen lagen jedoch um ein Drittel niedriger als die Maltosetransport-Raten. Die niedrigste Transportaktivität für Maltotriose zeigten Zellen aus Minimalmedium mit 7 % MD50, mit

1,1 nmol Maltotriose/mg Protein x min gleichsam der Maltosetransport-Aktivität. Auffällig ist, dass bei Zellen aus Anzuchten mit MD50 sowohl der Maltotriose- als auch der Maltosetransport bei steigender Substratkonzentration abnahm (1,1 nmol importierte Maltotriose gegenüber 3,2 nmol/mg Protein x min; vgl. Abbildung 6.6).

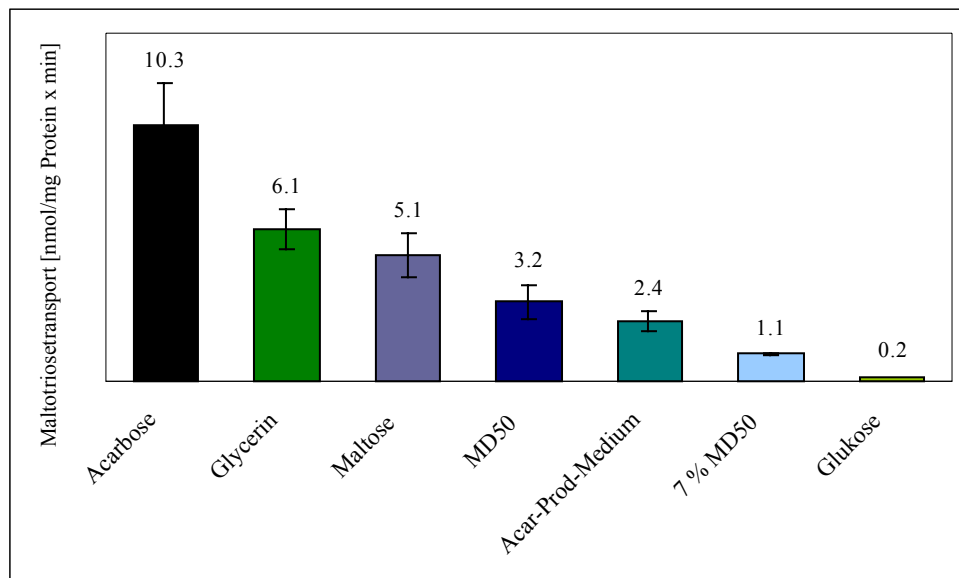


Abbildung 6.9: Durchschnittliche Maltotrioseaufnahme in Zellen von *Actinoplanes* sp. 223/29. Die Zellen wurden in Acarbose-Produktions-Medium bzw. Minimalmedium MNS mit den angegebenen Zuckern zu je 0,5 % bzw. 7 % MD50 kultiviert und nach 24 Stunden Wachstum für die Transportmessungen eingesetzt.

6.2.3.1. Spezifität der beobachteten Maltotriosetransport-Aktivitäten

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Spezifität der beobachteten Maltotriosetransport-Aktivitäten untersucht. Als Kohlenstoffquellen zur Anzucht der Zellen in Minimalmedium wurden Acarbose, Glycerin, Maltose und MD50 zu jeweils 0,5 % ausgewählt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden Wachstum geerntet, für die Transportmessungen vorbereitet und vor Zugabe radioaktiver Maltotriose (51 μ M) mit einem Überschuss an Acarbose und Maltose (1 mM) inkubiert (s. 5.7.7). Für die Abbildung 6.10 wurden drei (Glycerin-, Maltose- und MD50-Zellen) bzw. zwei (Acarbose-Zellen) unabhängig durchgeführte Hemmstudien zusammengefasst (vgl. auch Abbildung 6.7). Alle gewonnenen Werte wurden jeweils auf mg Protein/min berechnet und gemittelt und dann in Prozent des Kontrollwertes angegeben.

So wie Maltodextrine den Maltosetransport inhibierten, resultierte umgekehrt die Inkubation der Zellen von *Actinoplanes* sp. mit einem Überschuss an Maltose ebenfalls, unabhängig vom Wachstumssubstrat, in einer deutlichen Hemmung des Maltotriosetransports. Insgesamt allerdings waren, mit Ausnahme der deutlich am stärksten inhibierten Transportraten von Acarbose-Zellen (21 %), die Restaktivitäten des Maltotriosetransports in Gegenwart von Maltose in etwa doppelt so hoch wie die des Maltosetransports in Gegenwart von Maltodextrinen (47 % bis 52 % gegenüber 21 % und 28 %). Auffällig ist außerdem, dass – wiederum mit Ausnahme der Transportraten von Acarbose-Zellen – der Maltotriosetransport wie der Maltosetransport sensitiv gegenüber Acarbose war. Es wurde für den Maltotriosetransport von Zellen aus Anzuchten mit 0,5 % MD50 bzw. Maltose eine bis zu 41 %ige Hemmung durch Acarbose festgestellt.

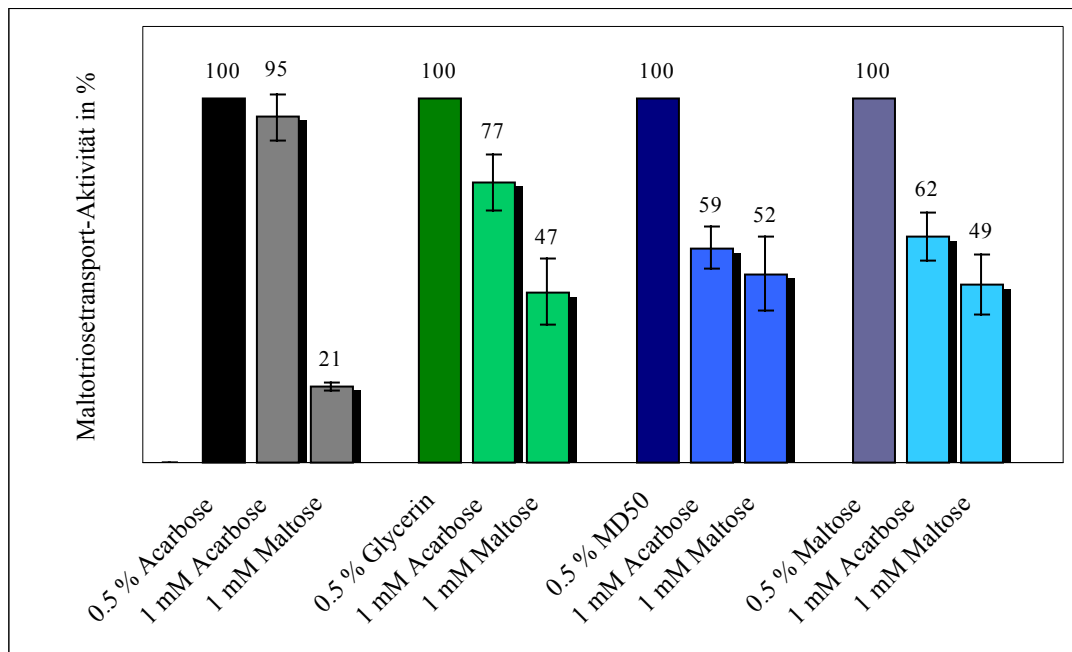


Abbildung 6.10: Inhibierung der Maltotrioseaufnahme durch verschiedene Zucker. Die Zellen wurden in Minimalmedium MNS mit je 0,5 % Acarbose, Glycerin, MD50 bzw. Maltose kultiviert und nach 24 Stunden Wachstum für die Hemmstudien eingesetzt. Die Zucker, deren Einfluss auf den Transport überprüft werden sollte, sind jeweils rechts neben den Wachstumszuckern (Kontrollwerte = 100 %) aufgeführt. Kontrollwerte waren die ohne zusätzlichen Zucker im Messansatz erreichten Transportraten. Sie lagen im Falle der Zellen, die mit Acarbose gewachsen waren, bei 9,3 nmol Maltotriose/mg Protein x min und bei solchen, die mit Glycerin angezogen wurden, bei 5,3 nmol Maltotriose/mg Protein x min. Die Kontrollwerte von Maltose- bzw. MD50-Zellen betrugen 5,6 bzw. 3,5 nmol Maltotriose/mg Protein x min.

6.2.4 Acarboseaufnahme in Zellen von *Actinoplanes* sp. 223/29

Das Modell des Acarbose-Metabolismus fordert neben einer Aufnahmekapazität für Maltose und Maltodextrine ebenso ein Acarbose-Transportsystem. Es konnte gezeigt werden, dass *Actinoplanes* sp. in der Lage ist, mit dem Pseudotetrasaccharid als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (s. Abbildung 6.4). Für Transportexperimente mit [¹⁴C]-Acarbose (5,7 µM) wurden Kulturen verwendet, die mit je 0,5 % Acarbose, Maltose, MD50, Saccharose und Trehalose angezogen wurden. Die Zellen wurden nach 24stündigem bzw. dreitägigem (Kultivierung mit Acarbose) Wachstum geerntet und, wie unter 5.7.7 beschrieben, für die Messungen vorbereitet.

Bei Zellen aus Kultivierungen in Minimalmedium mit je 0,5 % Maltose, MD50, Saccharose und Trehalose konnte nur eine geringe Menge intrazellulär akkumulierter [¹⁴C]-Acarbose festgestellt werden (0,1 nmol/mg Protein x min). Zellen aus der Kultivierung mit dem Pseudotetrasaccharid hingegen erreichten Transportraten von 1,2 nmol/mg Protein x min. Vergleichend wurden in Experimenten mit 6 µM [U-¹⁴C]-Maltose Transportraten von 1,2 nmol/mg Protein x min (Maltose-kultivierte Zellen) und 0,6 nmol/mg Protein x min (MD50-kultivierte Zellen) und 7,7 nmol/mg Protein x min (Acarbose-kultivierte Zellen) festgestellt. Die Untersuchung der Transportaktivität von Zellen aus der späten stationären Wachstumsphase ergab Raten von lediglich 0,2 nmol Acarbose/mg Protein x min.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass *Actinoplanes* sp. die angebotene Acarbose während des Messzeitraumes enzymatisch degradiert und lediglich den unmarkierten Maltosylrest importiert. In qualitativen Analysen der Cytosolfraktion per Dünnschicht-Chromatographie (nicht gezeigt) konnte aber das Vorhandensein einer Tetraose detektiert werden.

6.3 Identifizierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins aus dem Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp.

Die nachgewiesene Maltose/Maltotriose-Transportaktivität der Zellen wird vermutlich über zwei Bindeprotein-abhängige ABC-Transportsysteme realisiert (s. Abschnitt 6.2). Maltose und Maltodextrin-Bindeproteine wie z. B. die Proteine MalE aus *E. coli* oder *A. acidocaldarius* lassen sich charakteristischerweise durch Affinitätschromatographie mittels Agarose-gekoppelter Amylose reinigen (FERENCI & KLOTZ, 1978; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000).

So wurde überprüft, ob sich ein mögliches Maltose-Bindeprotein (MBP), vermutlich über einen N-terminalen Lipidanker in der Membran fixiert (s. auch 4.2.3.2), nach Solubilisierung via Amylose-Affinitätschromatographie (analog 5.7.15 und 5.7.16) isolieren lässt. Parallel dazu wurde versucht, über DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente mit Gensonden der Maltose-Bindeproteine aus *S. lividans* und *A. acidocaldarius* auf chromosomaler Ebene ein homologes Gen bei *Actinoplanes* sp. zu finden. Beide Strategien verliefen jedoch erfolglos. Im Zuge der Ermittlung der Synthesebedingungen für das Substratbindeprotein AcbH (s. Abschnitt 6.7) bei Anzucht von *Actinoplanes* sp. in Maltodextrin-haltigen Medien aber fiel in SDS-PAGE-Analysen von Kulturüberständen eine prominente Proteinbande bei einer für Bindeproteine typischen Laufhöhe von entsprechender relativer molarer Masse zwischen 40 und 45 kDa auf. Damit erschien ein Kandidat für ein Maltose/Maltotriose-Bindeprotein gefunden.

6.3.1 Isolierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins

Kulturüberstände aus 24 stündigen Zellanzuchten in Minimalmedium mit je 0,5 % Maltose und MD50 sowie in Acarbose-Produktions-Medium wurden, wie unter 5.7.16 beschrieben, aufgearbeitet und einer Affinitätschromatographie mit Agarose-gekoppelter Amylose unterzogen. Die Abbildung 6.11 zeigt eine Zusammenfassung der hierzu erzielten Ergebnisse.

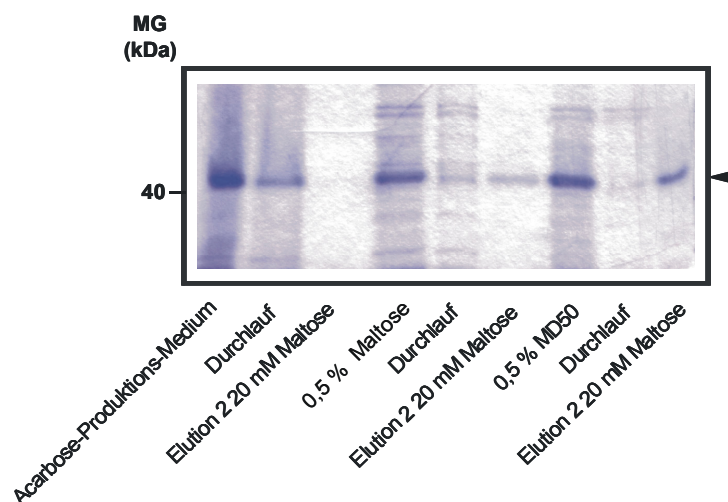


Abbildung 6.11: Isolierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Für die Isolierung des potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins wurden 2 ml konzentrierter Kulturüberstand auf 0,5 ml Amylose-Matrix pipettiert. Im Anschluss an Waschungen mit je 6 Säulenvolumina Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1 mM CaCl₂) wurde das Protein mit jeweils 0,5 ml 20 mM Maltose eluiert. Jeweils 36 µl der Proben des Säulenlaufs wurden untersucht. Das betrachtete Protein ist mit einem schwarzen Pfeilkopf (◄) markiert.

Mit 20 mM Maltose, oder auch Maltodextrinen (nicht gezeigt), konnte aus den Überständen von Kulturen aus Anzuchten mit MD50 und Maltose, nicht jedoch aus Anzuchten in Acarbose-Produktionsmedium, ein Protein mit Maltose/Maltodextrin-Bindeaktivität isoliert werden. In MALDI-TOF MS-Analysen (s. 5.7.17) konnte bestätigt werden, dass es sich bei den betrachteten Banden der Kulturüberstände im SDS-Gel nicht um verschiedene Proteine handelte, die sich während der Chromatographie unterschiedlich verhielten. Da sich das potentielle MBP bei Kultivierung der Zellen in Acarbose-Produktions-Medium in einer hochkonzentrierten Zuckerlösung befand (ca. 7 % MD50), wurde deshalb angenommen, dass es auch nach der Dialyse gegen Tris-Puffer noch mit Maltose und/oder Maltotriose bzw. längerkettigen Homologen ligandiert war, daher keine freie Bindekapazität für die Amylosematrix aufwies und unmittelbar im Durchlauf bzw. den Waschfraktionen wieder zu finden war.

Alternativ könnte die während der Kultivierung von den Zellen synthetisierte Acarbose das MBP über eine Dialyse hinaus blockieren (*die im Rahmen der Transportexperimente ermittelte Substratspezifität eines der postulierten Maltosetransporter deutet auf die Existenz eines Bindeproteins, das auch Acarbose akzeptiert*). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Proteine des Überstandes von Kultivierungen mit 0,5 % MD50 zur Simulation der hohen Zuckerkonzentration des Acarbose-Produktions-Mediums für je 15 Minuten mit 7 % Acarbose bzw. parallel 7 % MD50 bei 30°C inkubiert. Nach exzessiver Dialyse gegen Tris-Puffer konnte nur das MBP aus dem Ansatz, der mit Acarbose inkubiert worden war, affinitätschromatographisch isoliert werden. Das Protein aus dem Ansatz mit der hohen MD50-Konzentration hingegen verhielt sich wie dasjenige aus dem oben beschriebenen Säulenlauf mit Kulturüberstand nach Anzucht der Zellen in Acarbose-Produktions-Medium. Zusammen mit dem im weiteren Verlauf der Experimente erhaltenen Befund, dass 20 mM Acarbose das MBP nicht von der Amylosematrix eluierten, erhärtete dies die Hinweise auf die Identifizierung eines Acarbose-insensitiven Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins.

Ein diesem potentiellen MBP entsprechendes Protein war auch in Kulturüberständen von Zellanzuchten in Vollmedium TSB und in Minimalmedium mit 7 % MD50 und je 0,5 % Acarbose bzw. Glycerin vorhanden (nicht gezeigt).

Die durch die MALDI-TOF MS-Analyse des isolierte Proteins identifizierten Sequenzen einzelner Peptide sind im Anhang aufgeführt. Die Arbeiten hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sophie Haebel, Universität Potsdam, durchgeführt. Die Suche nach signifikanten

Übereinstimmungen zu anderen Proteinen mit Hilfe des erhaltenen Peptid-Massenspektrums, das für das potentielle Maltose/Maltotriose-Bindeprotein eine relative molare Masse von 51,3 kDa angibt, und den Peptidsequenzen in Datenbanken erbrachte leider keine Hinweise auf die Funktion dieses Proteins von *Actinoplanes* sp..

6.3.2 Klonierung des Gens eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins

Für die Identifizierung eines Maltose-Bindeproteins auf chromosomaler Ebene wurden in verschiedenen DNA-DNA-Hybridisierungen (s. 5.6.9) mit chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. 50/110 zunächst DIG-markierte Sonden der *malE*-Gene aus *S. lividans* und *A. acidocaldarius* verwendet. Die Amplifikationen per PCR und anschließenden Modifizierungen mit DIG sind unter 5.6.3 und 5.6.9.4 beschrieben. Die Amplifikation des *malE*-Gens von *S. lividans* erfolgte dabei mit Primern, die von der Sequenz des *malE*-Gens von *S. coelicolor* abgeleitet wurden (VAN WEZEL ET AL., 1997b). In keinem der Verfahren konnte eine Hybridisierung der Sonden mit chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. detektiert werden.

Schließlich gelang es, mit zwei weiteren DIG-markierten Oligos Hybridisierungssignale zu erhalten. Deren Nukleotidsequenzen wurden anhand der Peptidsequenzen des in 6.3.1 charakterisierten potentiellen Maltose/Maltotriose-Bindeproteins unter Berücksichtigung der bisher für *Actinoplanes* sp. ermittelten „codon usage“ (STRATMANN, 1997) generiert. Dabei gab die Verwendung des degenerierten Oligos „fishingMBP2“ (s. Seite 29, Tabelle 5.3), welches aufgrund eines im zugehörigen Peptid hohen Anteils an Aminosäuren mit relativ invarianten Kodons (W, Y, D, F und N) ausgewählt wurde, sehr distinkte Hybridisierungssignale. Hierfür wurde chromosomale DNA von *Actinoplanes* sp. über Nacht mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Sal*I und *Sma*I behandelt. Nach einem Southern-Blot-Verfahren (s. 5.6.9) wurden die Signale mittels Hyperfilm sichtbar gemacht (Abbildung 6.12).

Für die weitere Analyse der identifizierten DNA-Fragmente sollten die nach erneuter Restriktion der DNA mit *Sal*I und *Sma*I und Auftrennung in einem Agarosegel entsprechenden Banden bei ~ 5,5 kB und ~ 3 kB aus dem Gel eluiert und in geeignete Vektoren, z. B. pUC18 und pUC19, subkloniert werden. Jedoch konnte bislang im weiteren Verlauf des Verfahrens keine ausreichende Anzahl an Transformanten für Koloniehybridisierungen erhalten werden.

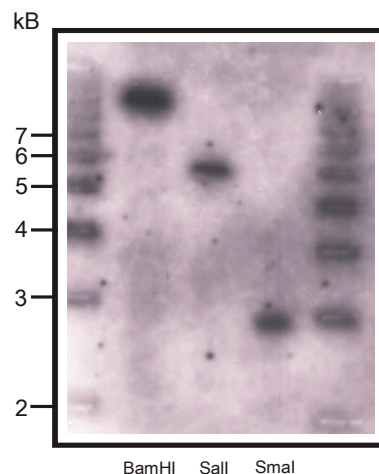


Abbildung 6.12: DNA-DNA-Hybridisierung. Dargestellt ist die Hybridisierung der DIG-markierten Sonde „fishingMBP2“ mit Fragmenten chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. 50/110. Nach dem Verdau der DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurden die Fragmente in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit 50 ng Sonde/ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 56°C. Die erhaltenen Signale liegen bei DNA-Fragmenten mit den Größen ~ 10 kB (*Bam*HI), ~ 5,5 kB (*Sal*I) und ~ 3 kB (*Sma*I).

6.3.3 Zusammenfassung

Actinoplanes sp. ist in der Lage, so unterschiedliche Substanzen wie Glycerin, Trehalose, Saccharose und Maltooligosaccharide als Kohlenstoffquellen zu nutzen. Auch der durch dieses Bakterium synthetisierte Sekundärmetabolit Acarbose konnte als C-Quelle verwertet werden, löste aber nach 24stündiger Kultivierung einen abrupten Stillstand des Zellwachstums aus.

Sämtliche dieser Zucker führten zur Ausbildung von Transportkapazitäten für Maltose und Maltotriose. Während die höchsten Transportraten bei Zellen nach Anzucht mit Acarbose oder Glycerin beobachtet wurden, zeigten Zellen aus Maltose- und Maltodextrinhaltigen Medien die niedrigsten Raten. Der Maltoseimport war durch Maltodextrine, Trehalose und Saccharose inhibierbar. Für den Maltotriosetransport wurde eine Hemmung durch Maltose nachgewiesen. Darüber hinaus hemmte auch Acarbose die Aufnahme von Maltose und Maltotriose. Eine Ausnahme bildet das Transportsystem von Zellen, die mit dem Pseudotetrasaccharid kultiviert wurden. Hier konnte keine Sensitivität gegenüber Acarbose festgestellt werden. Die unterschiedlichen Spezifitäten der erfassten Transportaktivitäten deuten an, dass *Actinoplanes* sp. über zwei verschiedene Systeme zum Import von Maltooligosacchariden verfügt. Die ermittelten kinetischen Daten des Maltosetransports von Zellen

aus Kultivierungen mit Acarbose, Glycerin, Maltose und dem Maltose/Maltotriose-Gemisch MD50 erlauben keine eindeutige Differenzierung der involvierten Transporter. Die hohen Substrataffinitäten von $K_m = 3 \mu\text{M} - 33 \mu\text{M}$ lassen sich jedoch mit der Annahme vereinbaren, dass der Maltoseimport über einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportmechanismus realisiert wird. Die Beteiligung eines Phosphotransferase-Systems kann ausgeschlossen werden. Ein potentielles Maltose/Maltodextrin-Bindeprotein konnte aus Kulturüberständen nach Zellanzuchten mit Maltose und MD50 isoliert werden. Dieses Protein hat keine Sensitivität gegenüber Acarbose.

Der Import von Acarbose konnte deutlich nur bei solchen Zellen nachgewiesen werden, denen das Pseudotetrasaccharid auch zum Wachstum angeboten wurde. Sowohl die Wachstums- als auch die Transportraten waren im Vergleich zu Verwertung und Import von Maltose vermindert.

6.4 Heterologe Synthese und Reinigung des Proteins AcbH

Innerhalb des Acarbose-Biosynthese-Genclusters von *Actinoplanes* sp. liegt das Gen *acbH*, welches für ein potientes Zucker-Bindeprotein der CUT1-Familie (s. 4.2.3.2) als Komponente eines ABC-Importers kodiert. Hinweise zum Substratspektrum gab es aufgrund der Hypothese zum Acarbose-Metabolismus, die den Import von Maltose und Maltodextrinen sowie Acarbose und seinen Derivaten fordert (s. 4.1). Für Experimente zur Ermittlung der Substratspezifität dieses Proteins AcbH war es zunächst notwendig, ein Expressionssystem für *acbH* zu etablieren, um ausreichende Mengen des Proteins reinigen zu können. Daher wurden verschiedene Plasmide für die heterologe Synthese von Strep-TagII- bzw. (His)₆- und (His)₁₀-AcbH-Fusionsproteinen in *E. coli* und *S. lividans* TK23 konstruiert (s. 5.6.8), um diese schließlich mittels Strep-Tactin- bzw. Ni-NTA- Affinitätschromatographie zu reinigen. Für die Verwendung der zuvor aufgeführten Expressionsstämme galten gleichgewichtige Argumente, denn der höhere Verwandtschaftsgrad von *S. lividans* zu *Actinoplanes* sp. bot Vorteile im Hinblick auf die „codon usage“. Dem gegenüber standen die Vorzüge einer einfacheren Handhabung von *E. coli*-Zellen.

Aufgrund der Absicht, das Bindeprotein aus dem Cytosol des jeweiligen Wirtsstammes zu reinigen, fehlt den Klonen der für das Signalpeptid kodierende Sequenzabschnitt. Das Signalpeptid von AcbH bilden die 29 N-terminalen Aminosäuren des Prelipoproteins mit einer typischen Lipobox (27LAA₃30C) für die Prozessierung durch die Signalpeptidase II (FEKKES & DRIESSEN, 1999; TJALSMA ET AL., 2000). Die vermutete Spaltstelle wurde durch Analyse mit dem SignalP V1.1-Programm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) (NIELSEN ET AL., 1999) bestätigt. Außerdem wurde das Cystein, an dem das native Protein die N-terminale Lipidmodifikation erfährt, durch ortsspezifische Mutagenese zu Alanin oder Methionin umgewandelt. Dadurch sollte ein lethaler Effekt einer möglichen Lipidmodifikation vermieden werden (KEMPF ET AL., 1997). In einem alternativen Ansatz sollte eine mit dem Signalpeptid PelB fusionierte AcbH-Variante in einer Anreicherung des Proteins im Periplasma von *E. coli* resultieren.

6.4.1 Klonierungen von *acbH*

Subklonierung von *acbH* auf Grundlage eines fehlerhaften Template: Mit dem Ziel der heterologen Expression in *E. coli* wurde das *acbH*-Gen in die Expressionsvektoren pBAD/HisA und pASK-IBA7 kloniert, um AcbH N-terminal mit einem (His)₆-Tag bzw.

einem Strep-TagII zu fusionieren. Als Template für die Amplifikation von *acbH* mittels PCR diente das Plasmid p103B3.1 (M. Jarling, AG Prof. Piepersberg, Wuppertal). Die Induktion der Genexpression von den als pCB2 und pCB3 bezeichneten Plasmiden durch Arabinose bzw. Anhydrotetracyclin führte in beiden Fällen zu einer sehr schwachen Synthese überwiegend unlöslicher Proteinaggregate in den *E. coli*-Stämmen TOP10 und LMG194 bzw. JM109. Der Nachweis wurde durch eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-(His)₅-Antikörper bzw. Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase geführt. Auch durch Variation der Kultivierungs- und Induktionsparameter wie Verwendung verschiedener Nährmedien (LB, 2 x LB, 2YT, NB und TPi), Wachstumstemperaturen (26, 30 und 37°C) und Induktorkonzentrationen sowie Induktions- und Erntezeitpunkte ließ sich keine Optimierung der Synthese erreichen.

Daraufhin wurde mit pQE9 als Vektorhintergrund ein weiteres Expressionssystem für *acbH* konstruiert, das an den N-Terminus des Proteins die Sequenz RGS(His)₆GS fusioniert. Nach Induktion der Genexpression vom resultierenden Plasmid pCB4 durch IPTG konnte in diesem Fall die starke Synthese eines Proteins als N-terminale (His)₆-Fusion über die immunologische Analyse eines Western Blots mit Anti-RGS-Antikörpern nachgewiesen werden. Das Protein lag allerdings ebenfalls in aggregierter Form vor. In diesem Fall gelang es jedoch, durch sukzessives Kombinieren einzelner Kultivierungs- und Induktionsparameter den löslichen Anteil von AcbH im Cytosol von *E. coli* JM109 entscheidend zu erhöhen. Dabei wurde neben den für die Expression des *acbH*-Gens von pCB2 und pCB3 erwähnten Variationen auch die Ko-Expression mit einem Chaperon getestet (von pOFX-tac-SL1). So konnte eine Reinigung des Proteins über Ni-NTA-Chromatographie und anschließende Ionenaustauschchromatographie erreicht werden. Es folgten Experimente zur Aufklärung der Substratspezifität durch Amylose-Affinitätschromatographie (Methodik entspr. 5.7.16), durch Fällungsexperimente mit radioaktiv markierter Maltose (analog 5.7.9) sowie Immobilisierungsversuche auf dem BIAcore-Sensorchip Ni-NTA (s. 5.7.10). Des weiteren wurden mit dem von pCB4 synthetisierten Protein polyklonale Antikörper hergestellt, woraufhin mit der Eruierung des Syntheseprofils des wt-AcbH in *Actinoplanes* sp. begonnen wurde. Entgegen der Erwartung führten Western-Blot-Analysen (s. 5.7.6) unter keinen Bedingungen zur Detektion des Proteins in Zellfraktionen. Diese Tatsache veranlasste zur Kontrolle der bisher angewandten Klonierungsstrategien. Da hierbei keine Fehler unterlaufen waren, wurde das klonierte Gen in pCB4 durch Sequenzierung analysiert. Für eine Überprüfung des Plasmids pCB4 gab es zuvor keinerlei Motivation, da dass synthetisierte

Protein im SDS-Gel die erwartete Größe von ca. 46 kDa zeigte und zudem die N-terminale (His)₆-Fusion an diesem Protein mit einem Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Es stellte sich heraus, dass ab dem fünften Nukleotid der *acbH*-Sequenz keine weitere Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz des klonierten Fragmentes vorhanden war. Zumindest die Fusion und die korrekte Klonierung im Hinblick auf die Einhaltung des Leserahmens und den Austausch von Cystein zu Methionin wurden durch die Sequenzierung bestätigt. Somit ist zu erklären, warum die Western-Blot-Analysen nicht gelingen konnten, denn im Antiserum waren keine Antikörper gegen AcbH vorhanden.

Als Kontrolle für den Erfolg der angewandten Methoden zur Charakterisierung des AcbH-Proteins sollte das Maltose-Bindeprotein MalE aus *E. coli* dienen, das ebenfalls als (His)₆-Fusionsprotein rekombiniert wurde (*malE* ohne Sequenz für das Signalpeptid in pQE9, s. 5.6.8.1). Nach Induktion der Genexpression vom resultierenden Plasmid pCB5 durch IPTG konnte das Protein leicht sowohl über Ni-NTA- als auch Amylose-Affinitätschromatographie (analog 5.7.12 und 5.7.16) gereinigt werden. Die in diesem Falle homologe Expression verlief quantitativ und qualitativ äußerst erfolgreich, das Protein ließ sich sauber in hohen Mengen und aktiv reinigen.

Zu dieser Zeit traten korrigierte Sequenzdaten zu *acbH* vom Kooperationspartner auf.

Anstelle der viert- und drittletzten Kodons für die Aminosäuren Thr und Ile zeigte die neue Sequenz die Aminosäuren Ala und Asp. Für die sukzessive Konstruktion sämtlicher neuer Expressionssysteme (pCB6 – pCB9) wurde chromosomale DNA von *Actinoplanes* sp. 50/110 präpariert (s. 5.6.1.2) und anstelle des bisher eingesetzten p103B3.1 als Template für die Amplifikation des *acbH*-Gens verwendet. pCB6 wurde unter Einsatz eines für die PCR neu generierten 3'-Primers entsprechend der Strategie für pCB4 hergestellt. pCB7 stellt eine Variante von pCB6 dar, in der das Cystein nicht wie bisher durch Methionin sondern durch Alanin ausgetauscht ist. Im Rahmen der weiteren Optimierung der Synthese in Richtung eines löslich im Cytosol vorliegenden Proteins wurde außerdem ein AcbH-Fusionsprotein mit C-terminalem (His)₆-Tag entwickelt (in pQE60, pCB8). Da die zwischenzeitlich unternommenen Versuche zur Immobilisierung des (His)₆-MalE an die Sensor-Chips CM5 und Ni-NTA unbefriedigend verliefen, in letztgenanntem Fall vermutlich aufgrund mangelnder Affinität zur Ni-Matrix, wurde des weiteren eine Variante von AcbH mit einem längeren (His)₁₀-Tag rekombiniert (pCB9, *acbH* in pET19b). Die Sequenzanalyse dieser vier neuen Expressionssysteme identifizierte nach dem Nukleotid 288 des *acbH*-Gens jeweils stets

einen zusätzlichen Sequenzbereich von 48 Nukleotiden. Parallel zu dieser Feststellung ergab sich in Kommunikation mit der Wuppertaler Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Piepersberg, dass im selben Zeitraum ebenfalls Sequenzunstimmigkeiten innerhalb des *acb*-Genclusters erkannt wurden, die der weiteren Analyse bedurften. Daraufhin wurde dort begonnen, eine erneute Sequenzanalyse des gesamten Acarbose-Biosynthese-Genclusters durchzuführen.

Unterdessen, in Abwartung eines Konsens der Sequenzdaten, wurden die Arbeiten mit pCB6 – pCB9 fortgesetzt. Dies schien gerechtfertigt, denn die identifizierten Sequenzbereiche waren für die Richtigkeit der heterolog synthetisierten Proteine nicht von Bedeutung. Sie verursachten keinen frame shift und waren nicht durch die Klonierungsstrategien beeinflusst. Da hier für die Amplifikationen von *acbH* chromosomale DNA als Template eingesetzt wurde, spiegelten die identifizierten Bereiche vielmehr die tatsächliche Sequenz des *acbH*-Gens wider und somit lagen dem Wildtyp entsprechende AcbH-Varianten vor. Außerdem galt es, neues Anti-AcbH-Antiserum für die Aufklärung des Syntheseprofils des wt-AcbH in *Actinoplanes* sp. zu erhalten. Zusammenfassend beschrieben, konnte durch Expressionsanalysen dieser vier neuen Klone per SDS-PAGE mit Ausnahme des pCB8 eine starke Überproduktion der jeweiligen AcbH-Varianten durch die *E. coli*-Stämme JM109 (pCB6, pCB7 und pCB8) und BL21(DE3)<pLysS> (pCB9) gezeigt werden, die erneut fast ausschließlich als unlösliche Aggregate im LSP vorlagen.

Die Optimierung der Synthese eines (His)₆-AcbH-Fusionsproteins in Richtung einer Erhöhung des Anteils löslichen Proteins wurde mit den für die Expressionssysteme pCB2 – pCB4 beschriebenen Methoden (s. Seite 67) versucht. Um die Expression der GC-reichen DNA des *acbH*-Gens zu unterstützen, erfolgten außerdem Untersuchungen zur heterologen Synthese von AcbH in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus-RP, der plasmidkodierte Kopien der *argU* und *proL* tRNA-Gene enthält. Des weiteren wurde mit zwei Expressionsstämmen (BB4564 und BB4565) mit einem GroEL⁻ Phänotyp gearbeitet, um in Anlehnung an Ergebnisse von MAR CARRIÓ & VILLAYERDE (2003) eine mögliche Chaperon-vermittelte Aggregation von AcbH zu reduzieren. Aufgrund der insgesamt nur geringen Proteinausbeuten wurde alternativ zu den Modifikationen der Expressionsparameter dazu übergegangen, das aggregierte AcbH nach einer Solubilisierung mit 8 M Harnstoff und anschließender Renaturierung zu nutzen. Zur Renaturierung des gereinigten Proteins wurden verschiedene Methoden angewandt (s. 5.7.13). Dabei erbrachten weder die langsame Dialyse mit Hilfe des Renaturierungsreagenz Roti[®]-Fold (8x) der Firma ROTH noch eine schnelle Dialyse gegen 1000-faches Volumen Puffer (50 mM Tris, pH7,2, 300 mM NaCl,

5 % Glycerin) den gewünschten Erfolg. In einem weiteren Verfahren wurde unter Zusatz von 4,8 mM β -Cyclodextrin die „Artificial Chaperon“-Methode nach DAUGHERTY *ET AL.* (1998) versucht. Diese Methodik verlief ebenfalls erfolglos, schließlich konnte aber durch Einsatz des „low molecular weight additive“ Arginin eine zufriedenstellende Renaturierung von AcbH erzielt und auch im Falle des (His)₁₀-AcbH nach Expression von pCB10 angewandt werden (Abschnitt 6.4.3).

Die **endgültigen Sequenzdaten nach Resequenzierung** des gesamten *acb*-Genclusters bestätigten die durch die vorliegende Arbeit gefundenen Insertionen. Jedoch waren die beiden Aminosäuren Thr und Ile, die zuvor Anlass gaben, die neuen Plasmidkonstrukte pCB6 – pCB9 mit Ala und Asp zu erzeugen, durchaus korrekt. Für die Experimente zur Substratspezifität jedoch war es unerlässlich, ein Protein mit fehlerfreier Sequenz einzusetzen. Daher wurden drei weitere Klone (pCB10 - pCB12, s. 5.6.8.2 – 5.6.8.4) für die Synthese von ausschließlich (His)₁₀-AcbH-Fusionsproteinen hergestellt. Hierbei wurden zur Generierung der jeweiligen 3'-Primer für die Amplifikationen des *acbH*-Gens vom Chromosom die Sequenzen so ausgewählt, dass das Anlagern an das Template außerhalb des *acbH*-Gens erfolgte. So sollte in diesem kritischen Bereich der Sequenzvariationen jeglicher Einfluss vermieden werden. Nach Sequenzanalyse dieser Klone konnten Thr und Ile tatsächlich als die viert- und drittletzten Aminosäuren von AcbH verifiziert werden (Manuskript zur Veröffentlichung der *acb*-Gene in Vorbereitung; U. Wehmeier, pers. Mitteilung) .

Da zwei Aminosäuren für ein polyklonales Antiserum kein relevantes Epitop darstellen, wurde davon ausgegangen, dass die beiden Aminosäureaustausche nicht störend waren. Um absolute Sicherheit zu erreichen, wurde das Aliquot gereinigten (His)₆-AcbH von pCB7, welches für die erneute Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde (s. 5.7.5), zusätzlich einer MALDI-TOF MS-Analyse unterzogen und konnte damit als das Protein AcbH bestätigt werden (s. 5.7.17).

Die Herstellung der drei neuen Plasmidkonstrukte pCB10 – pCB12 sowie die Synthese und Reinigungen der (His)₁₀-Fusions-Proteine sind auf den folgenden Seiten unter 6.4.2 und 6.4.3 beschrieben.

6.4.2 Heterologe Synthese von AcbH in *S. lividans* TK23 und Reinigung

Für die Reinigung des AcbH aus *S. lividans* per Ni-Affinitätschromatographie musste vorab ein geeignetes Expressionssystem konstruiert werden, das N-terminal an das Protein einen (His)₁₀-Tag fusioniert. Dafür wurde zunächst das Plasmid pCB10 (s. Abschnitt 6.4.3) einer ortsspezifischen Mutagenese unterzogen, um die Restriktionsschnittstelle für *Nde*I unmittelbar vor dem Gen zu eliminieren (= pCB11, s. 5.6.8.3). Von diesem Template wurde dann das *acbH*-Gen zusammen mit der Sequenz für den His-Tag in einer PCR amplifiziert und schließlich über die durch die mismatch-Primer vorgegebenen Schnittstellen *Nde*I/*Bam*HI in den Shuttle-Vektor pPWW49-GenPoly kloniert (= pCB12, s. 5.6.8.4). Durch die Klonierung ist N-terminal an AcbH die Sequenz MH₁₀SSGHIDDDDKH fusioniert. Die Anzucht von *S. lividans* TK23 <pCB12> erfolgte, wie unter 5.7.12 beschrieben. Nach einer Zellfraktionierung (s. 5.7.1.2) wurde die Lokalisation des Expressionsproduktes durch Western Blot-Analysen analysiert (s. 5.7.6) (nicht gezeigt). Das lösliche Protein AcbH befand sich innerhalb der Cytosolfraktion.

Das gewonnene Cytosol wurde mit der Absicht verwendet, das (His)₁₀-AcbH über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. 5.7.12) zu reinigen. Da hier wie auch bei der Darstellung des Gesamtproteins in einer SDS-PAGE keine für AcbH prominente Proteinbande identifiziert werden konnte (nicht gezeigt), wurde der Verlauf der Chromatographie in einem Western Blot nachgeprüft (Abbildung 6.13A und B).

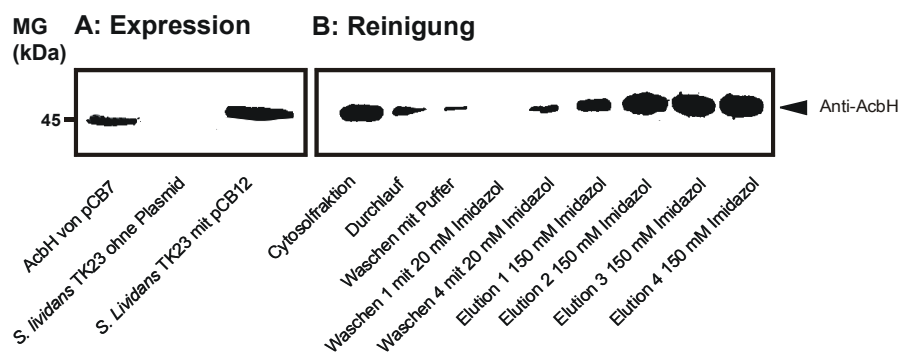


Abbildung 6.13: Nachweis der heterologen Expression von *acbH* in *S. lividans* TK23 <pCB12> und Reinigung des (His)₁₀-AcbH-Fusionsproteins über Ni-Affinitätschromatographie. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der immunologische Nachweis des (His)₁₀-AcbH (47,3 kDa) mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. Als Blotkontrolle diente das (His)₆-AcbH von pCB7 (44,8 kDa). **A:** Für den Nachweis der Expression von *acbH* wurden 30 µg (20 µl) Gesamtprotein von *S. lividans* TK23 <pCB12> bzw. von Zellen ohne Plasmid (Kontrolle) analysiert. **B:** Für die Reinigung von (His)₁₀-AcbH wurden 4 ml Cytosolfraktion mit 0,5 ml Ni-Matrix für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach Waschungen mit 4 Säulenvolumina MNS-Medium pur und mit 20 mM Imidazol erfolgte die Elution mit jeweils 0,5 ml 150 mM Imidazol. Jeweils 30 µl der Proben des Säulenlaufs wurden untersucht.

Festgestellt werden konnte, dass der überwiegende Teil von (His)₁₀-AcbH an die Ni-Matrix gebunden und mit Imidazol wieder eluiert wurde. Jedoch war der Reinigungseffekt unbefriedigend, da im zugehörigen SDS-Gel zahlreiche weitere Proteine in den Eluatfraktionen sichtbar waren, die AcbH gegenüber quantitativ dominant unspezifisch an die Ni-Matrix gebunden hatten.

Im Rahmen der Ermittlung der Substratspezifität wurde das Potential des Proteins AcbH zur Bindung an Maltodextrine über die Affinität zu einer Amylose-Matrix überprüft (s. 5.7.16 und vgl. Abschnitt 6.3.1). Nach Anzucht von *S. lividans* TK23 <pCB12> und Zellfraktionierung wurden 1.5 ml Cytosol über 20 Stunden gegen 1000-faches Volumen MNS-Medium dialysiert und auf eine Säule mit 0,5 ml Amylose-Matrix gegeben, um schließlich (His)₁₀-AcbH mit 20 mM Maltodextrinen eluieren zu können. Der Verlauf der Chromatographie wurde nach Entwicklung eines Western Blots überprüft (Abbildung 6.14).

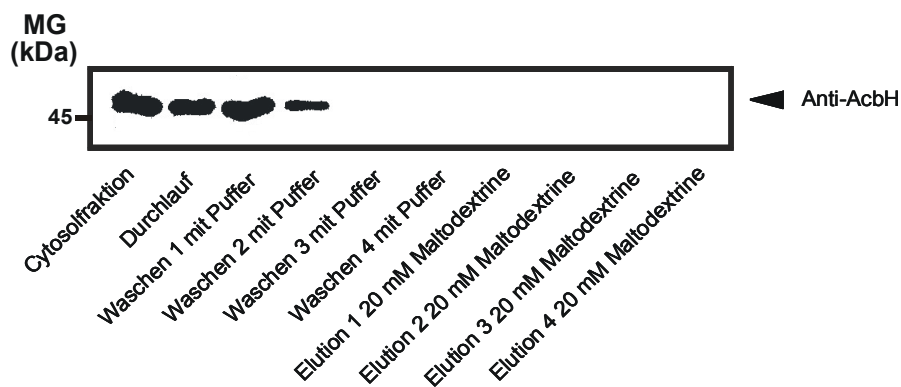


Abbildung 6.14: Überprüfung einer Maltodextrin-Bindeaktivität von (His)₁₀-AcbH. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der immunologische Nachweis des (His)₁₀-AcbH mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. 1,5 ml dialysiertes Cytosol wurden mit 0,5 ml Amylose-Matrix gut durchmischt, anschließend erfolgten vier Waschungen und vier Elutionsschritte mit 20 mM Maltodextrinen. Jeweils 30 µl dieser Proben wurden untersucht.

Dieses Experiment hat gezeigt, dass AcbH nicht über die Eigenschaft verfügt, Maltodextrine zu binden. Sämtliches auf die Säule pipettierte Protein wurde nicht von der Matrix zurückgehalten, sondern befand sich unmittelbar im Durchlauf oder in den ersten beiden Waschfraktionen.

6.4.3 Heterologe Synthese von AcbH in *E. coli* und Reinigung

Das *acbH*-Gen wurde für eine Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) <pLysS > ohne die für das Signalpeptid kodierende Sequenz nach Amplifikation durch PCR über die durch die mismatch-Primer vorgegebenen Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pET19b kloniert (= pCB10, s. 5.6.8.2). Dabei wurde das Cys-Kodon durch das Met-Kodon ausgetauscht, um eine mögliche Lipidmodifikation zu vermeiden. Durch die Klonierung ist N-terminal an AcbH die Sequenz MGH₍₁₀₎SSGHID₍₄₎KH fusioniert. Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3) <pLysS, pCB10> erfolgte, wie unter 5.7.12 beschrieben.

Das Protein AcbH befand sich, wie aufgrund der Vorversuche erwartet (s. Seite 69), in aggregierter Form innerhalb der LSP-Fraktion (Abbildung 6.15). Die Lokalisation des Expressionsproduktes wurde durch Western Blot-Analysen verifiziert (s. 5.7.6) (nicht gezeigt).

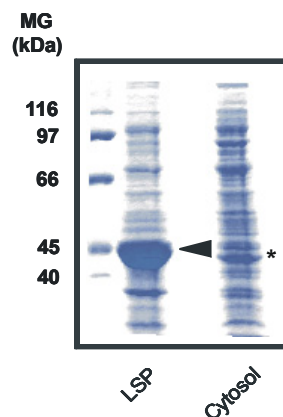


Abbildung 6.15: Nachweis der heterologen Expression von *acbH* in *E. coli* BL21(DE3) <pLysS, pCB10>. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Die Lokalisation des (His)₁₀-AcbH (47,3 kDa) ist mit einem schwarzen Pfeilkopf (◄) markiert. Jeweils 15 µl der Proben wurden untersucht. Hinweis: die in der Cytosolfraktion auffällige, vielversprechende Proteinbande auf der Höhe von 45 kDa (*) ist durch Immunoblotting nachweisbar nicht AcbH!.

Neben dem Ziel der intrazellulären Anreicherung des Proteins wurde auch versucht, durch Fusion mit dem PelB-Signalpeptid den Export in das Periplasma zu erreichen. Dafür wurde das *acbH*-Gen in den Expressionsvektor pET22b kloniert (= pCB14) und in den Stämmen *E. coli* C41 und C43 mit C-terminalem (His)₆-Tag exprimiert. Leider konnte in diesen Fällen keinerlei AcbH-Synthese beobachtet werden. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen mit den AcbH-Varianten der Expressionssysteme pCB6 – pCB9 wurden weitere Bemühungen, die Gewinnung des AcbH-Proteins im Hinblick auf seine Löslichkeit zu optimieren, vernachlässigt.

In Orientierung an Vorschläge von DE BERNARDEZ CLARK (2001) und MIDDELBERG (2002) wurde (His)₁₀-AcbH mit einer 8 M Harnstofflösung aus dem LSP solubilisiert und denaturierend über Ni-Affinitätschromatographie gereinigt (s. 5.7.12; Abbildung 16A).

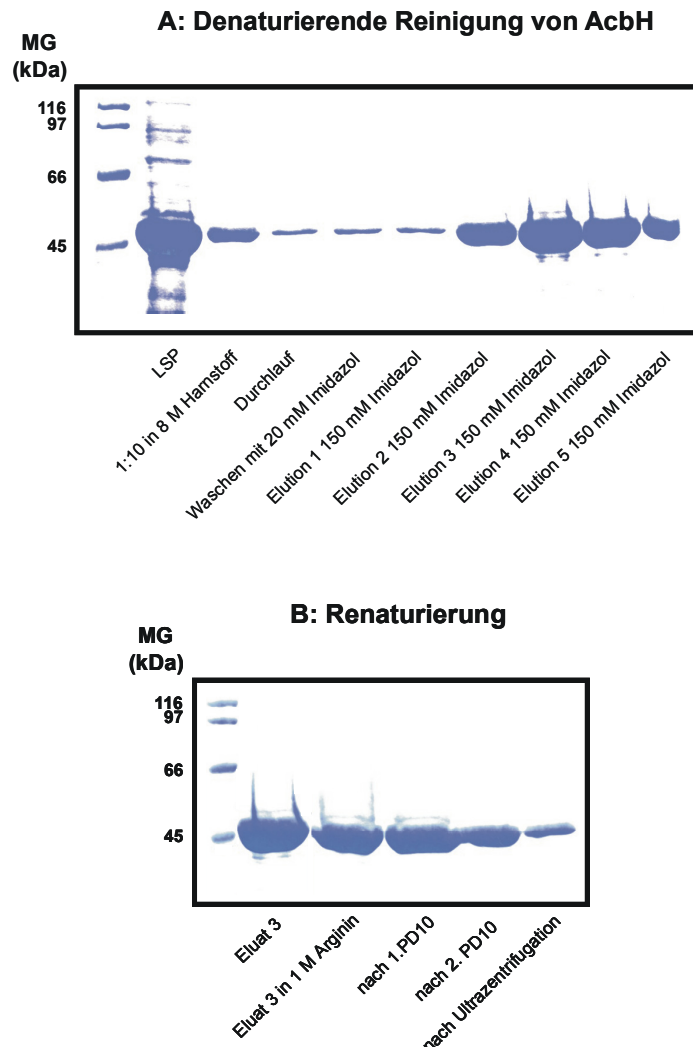


Abbildung 6.16: Denaturierende Reinigung und Renaturierung des (His)₁₀-AcbH-Fusionsproteins aus *E. coli* BL21(DE3) <pLysS, pCB10>. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. **A:** Für die Reinigung von (His)₁₀-AcbH wurden 5 mg LSP (4 ml) 1:10 in 8 M Harnstofflösung für 30 Minuten solubilisiert. Nach Ultrazentrifugation wurde das Solubilisat mit 2 ml Ni-NTA-Matrix inkubiert. Im Anschluss an Waschungen mit je 5 Säulenvolumina Puffer pur und mit 20 mM Imidazol wurde das Protein mit jeweils 1 ml 150 mM Imidazol eluiert. Jeweils 15 µl der Proben des Säulenlaufs wurden untersucht. **B:** Die Renaturierung wurde mit dem in Eluatfraktion 3 aus (A) enthaltenen AcbH durchgeführt. Nach einer 1,5:1 Verdünnung mit 2,5 M Arginin wurde das Protein über zwei hintereinandergeschaltete PD10-Säulen zunächst nach 1 M Arginin, dann nach Tris-Puffer umgesetzt. Durch abschließende Ultrazentrifugation konnte das im Überstand befindliche lösliche AcbH-Protein (0,23 µg/µl) für weitere Experimente genutzt werden. Jeweils 10 µl der Proben der Renaturierungsprozedur wurden untersucht.

Anschließend erfolgte eine Renaturierung zu löslichem Protein in zwei Schritten (Abbildung 16B), durch Austausch des Denaturierungsmittels zunächst gegen 1 M Argininlösung und dann

gegen Tris-Puffer mittels Gelfiltrationen (PD10-Säule) (s. 5.7.13). Nach einer abschließenden Ultrazentrifugation wurde reines AcbH aus dem resultierenden Überstand für die Substratbindestudien an einem BIAcore-Gerät verwendet (s. Abschnitt 6.5). Trotz der relativ hohen Verluste war die Ausbeute an löslichem Bindeprotein AcbH enorm: umgerechnet etwa 14 mg/l Liter Kultur.

Durch die Aufnahme eines CD-Spektrums (s. 5.7.14) konnte eine α -helikale Konformation des renaturierten Bindeproteins AcbH und damit die Voraussetzung für Aktivität nachgewiesen werden. Die Spektralcharakteristik entspricht der einer dominierenden helikalen Struktur mit Elliptizitätsminima bei 222 nm und 207 nm (Abbildung 6.17).

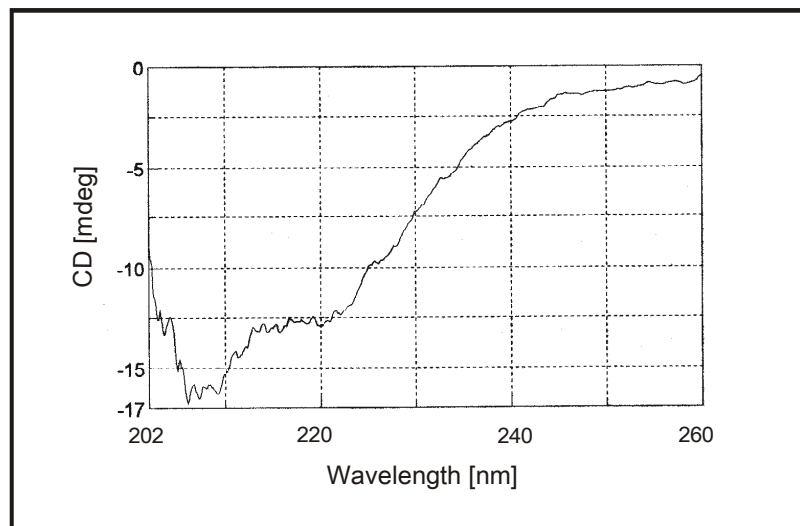


Abbildung 6.17: CD-Spektrum des renaturierten AcbH. Die Messung wurde mit einer Proteinkonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Das Protein lag vor in 20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 5 % Glycerin, 150 mM NaCl_2 . Die Anwesenheit von Chlorid-Ionen bei den Messungen war zwar störend, das Protein konnte aber nicht ohne NaCl bzw. alternativ mit NaF renaturiert werden.

Mit *E. coli* als heterologem Expressionsstamm konnten unter den Aspekten Ausbeute und Reinheit weitaus befriedigendere Ergebnisse erzielt werden, zumal durch das CD-Spektrum eine α -Helizität als Zeichen einer Rückfaltung nach der Renaturierung bestätigt wurde.

Im Rahmen der Optimierung der Renaturierung und nachdem bekannt war, dass AcbH keine Maltodextrin-Bindeaktivität besitzt (s. Abschnitt 6.4.2), wurde auch ein Ansatz gewählt, in dem während des Umpufferungsverfahrens Acarbose zu 20 mM in den jeweiligen Lösungen vorhanden war. In Abbildung 6.18 ist zu sehen, dass durch den Zusatz von Acarbose tatsächlich eine Verbesserung der Rückfaltung erzielt werden konnte. Dieses Experiment gab

einen ersten Hinweis darauf, dass vielmehr Acarbose zu den potentiellen Substraten dieses Proteins gehört.

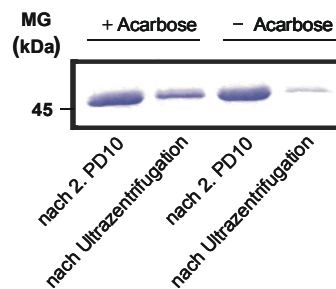


Abbildung 6.18: Wirkung von Acarbose auf den Renaturierungserfolg von (His)₁₀-AcbH. Die Renaturierungen wurden wie für Abbildung 16B beschrieben durchgeführt. Im parallelen Ansatz enthielten sowohl die Arginin- als auch die Tris-Lösung Acarbose (20 mM). Nach abschließender Ultrazentrifugation wurden die Anteile des in den jeweiligen Überständen befindlichen löslichen AcbH-Proteins in einer SDS-PAGE analysiert.

6.5 Substratbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz

Die aufgrund der bisherigen Experimente gefundenen Hinweise auf mögliche Substrate des potentiellen Zucker-Bindeproteins AcbH sollten in **Biomolekularen Interaktions-Analysen (BIA)** an einem BIAcore-Gerät überprüft werden. Unmittelbar nach der Reinigung und Renaturierung von (His)₁₀-AcbH (s. 5.7.12, 5.7.13) wurde das Protein, wie unter 5.7.10 beschrieben, auf einem Ni-NTA-Sensorchip immobilisiert. Als Referenzprotein für unspezifische Interaktionen der zu testenden Substrate diente (His)₁₀-MalK, das ABC-Protein des Maltosetransporters von *S. typhimurium*, welches mir freundlicherweise von Bettina Blüschke zur Verfügung gestellt wurde. Im Falle von MalK ergab sich eine Beschichtung von 6.000 RU (0,15 pmol), von AcbH konnten 13.000 RU (0,273 pmol) immobilisiert werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass unspezifische Zucker-Protein-Interaktionen wenn überhaupt in einem Maßstab größer als 1:1 (mehrere Zuckermoleküle pro ein Proteinmolekül) stattfinden, war dieser Beladungsunterschied nicht von Belang.

Als Zuckersubstrate wurden Acarbose sowie im Zuge der Acarbose-Biosynthese durch *Actinoplanes* sp. entstehende Derivate (Tabelle 6.2), aber auch Maltose, Maltodextrine und Saccharose getestet. Die daraus resultierenden Sensorgramme sind in den Abbildungen 6.19 und 6.20 dargestellt.

Tabelle 6.2: Strukturelle Unterschiede der NebenkompONENTEN im Vergleich zu Acarbose.

Bezeichnung	Komposition
Acarbose	Acarviosyl-1,4-Maltose
NebenkompONENTe 4A	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,4- Fruktose
NebenkompONENTe 4B	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,4- Glukose
NebenkompONENTe 4C	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,1- Glukose
NebenkompONENTe 5C	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,4- Glukose-1,1-Glukose
NebenkompONENTe 6A	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,4- Maltose-1,4-Fruktose
NebenkompONENTe 6B	Acarviosyl-1,4-Maltose-1,4- Maltose-1,4-Glukose

Die strukturellen Unterschiede untereinander und zu Acarbose sind fett gedruckt. Diese hier dargestellten, aus der Kulturbrühe von *Actinoplanes* sp. isolierten und freundlicherweise von Herrn Dr. Wehlmann (Bayer AG) zur Verfügung gestellten NebenkompONENTen der Acarbose-Biosynthese wurden in den Substratbindestudien an einem BIAcore-Gerät verwendet. NebenkompONENTengemisch 4A, 4B, 4C: Präparat LEJ 3333/3, NebenkompONENTe 5C: Präparat LEJ 3333/6, NebenkompONENTengemisch 6A, 6B: Präparat LEJ 3333/5.

Die Bindung von Acarbose und seinen Derivaten an das Protein AcbH wurde ganz klar nachgewiesen, hingegen konnten bei Substraten wie Maltodextrinen oder auch Maltose und Saccharose (nicht gezeigt) keine Interaktionen beobachtet werden. Von den Pseudooligosacchariden assoziierte Acarbose am stärksten, gefolgt von den längerkettigen NebenkompONENTen 5C und 6AB, die gegenüber Acarbose wiederum schneller dissoziierten.

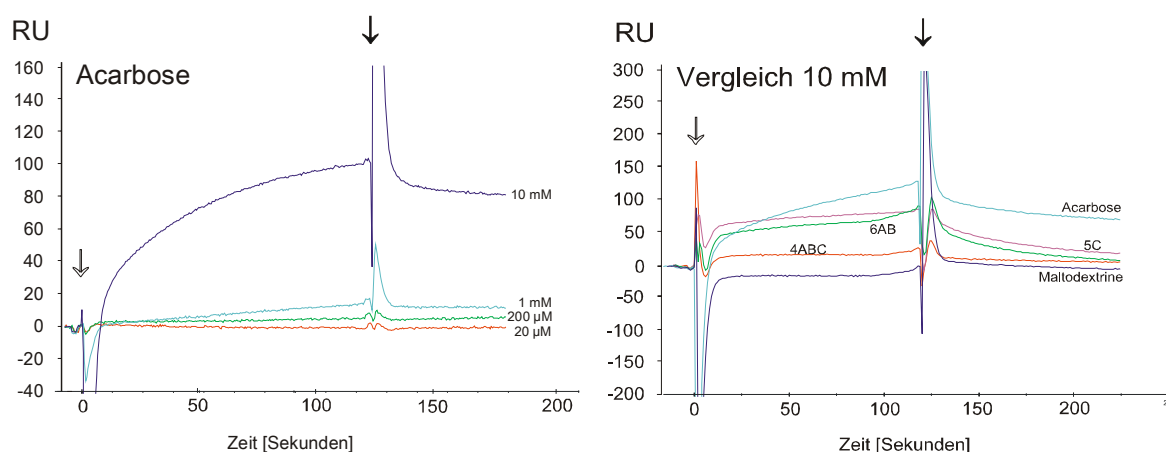


Abbildung 6.19: Sensorgramme der Interaktion von AcbH mit Acarbose und NebenkompONENTen. Im linken Bild ist die Bindung verschiedener Konzentrationen von Acarbose an AcbH vergleichend dargestellt. Die rechte Darstellung zeigt das unterschiedliche Bindungsvermögen der Acarbose-derivate in Relation zu Acarbose bei Konzentrationen von jeweils 10 mM. Hier ist auch zu sehen, dass Maltodextrine (ebenfalls 10 mM) keinerlei Affinität zu AcbH aufwiesen. Die Bezeichnung der NebenkompONENTen ist in Kurzform angegeben (KompONENTengemisch 4ABC, KompONENTe 5C, KompONENTen 6AB). Der weiße Pfeil kennzeichnet den Injektionsstart und den Beginn der Assoziationsphase, der schwarze Pfeil das Injektionsende und die Dissoziationsphase.

Nur relativ wenig Interaktion gab es mit den NebenkompONENTEN 4ABC. Legt man den optimalen Fall einer 1 : 1 Bindung von Acarbosemolekül zu Protein zugrunde ist theoretisch, unter Einberechnung der molaren Massen der beteiligten Partner und bei System-gegebener Korrelation von 1000 RU = 1 ng Makromolekül, eine Änderung der Response Units RU von 176 möglich. Bei Injektion von 10 mM Acarbose (645 g/mol) und einer resultierenden RU-Differenz von bis zu 130 waren somit 74 % von AcbH mit Zucker belegt, was für einen guten Renaturierungserfolg spricht. Für die Affinität des Zucker-Bindeproteins zu Acarbose wurde durch die BIAcore-Software in einem Fit nach Langmuir (1 : 1) eine Konstante $K_D = 3,8 \times 10^{-3} \text{ M}$ ermittelt.

Die Affinität von AcbH zu der NebenkompONENTE 5C betrug $K_D = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, für das NebenkompONENTengemisch 6AB wurde die $K_D = 1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$ berechnet.

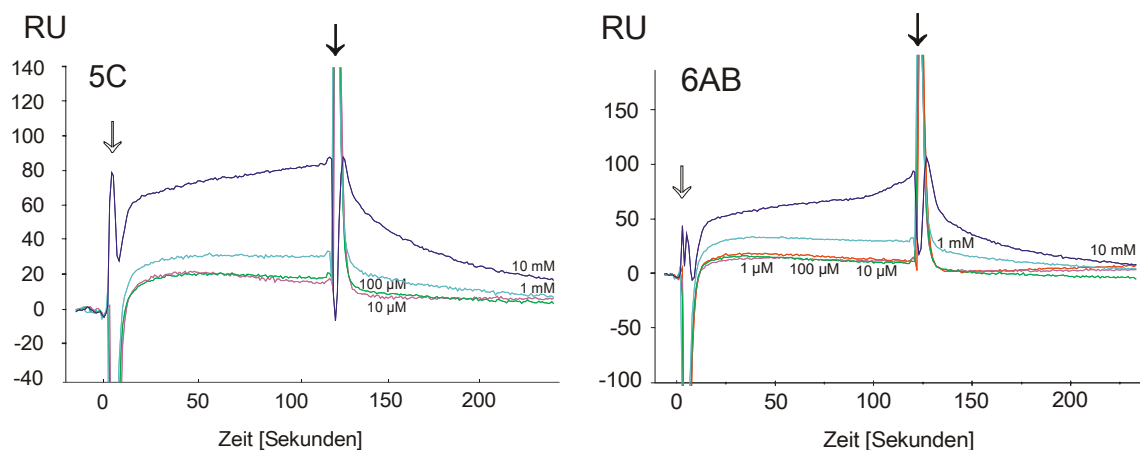


Abbildung 6.20: Sensorgramme der Interaktion von AcbH mit den NebenkompONENTEN 5C, 6AB. Im linken Bild ist die Bindung verschiedener Konzentrationen des Acarbosederivates 5C mit AcbH vergleichend dargestellt, im rechten Bild ist es das Gemisch der Acarbosederivate 6A und 6B. Der weiße Pfeil kennzeichnet den Injektionsstart und den Beginn der Assoziationsphase, der schwarze Pfeil das Injektionsende und die Dissoziationsphase.

6.6 Heterologe Synthese und Reinigung der Proteine AcbFG und MsiK

Das Gen für das Acarbose-Bindeprotein AcbH (s. Abschnitt 6.5) bildet zusammen mit den *acbFG*-Genen, die für die zwei Membrankomponenten eines ABC-Importers kodieren, innerhalb des Acarbose-Biosynthesegenclusters eine Transkriptionseinheit. Das Gen für einen den Transporter komplettierenden ABC-Protein zur notwendigen Energetisierung des Transportvorgangs hingegen ist, wie bei grampositiven Bakterien durchaus üblich, nicht in diesem Cluster vertreten (s. 4.2.3.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifizierung eines möglicherweise assistierenden ABC-Proteins (MsiK) und zur heterologen Synthese der Membranproteine AcbFG sowie zu Reinigungsversuchen des Komplexes AcbFG-MsiK₂ zwei Diplomarbeiten angefertigt (SCHÄFER, 1999; ELVERS, 2002). Deren Ergebnisse werden hier zusammenfassend dargestellt.

6.6.1 Identifizierung, heterologe Synthese in *E. coli* und Reinigung von MsiK

Mit Hilfe der Verwendung des *msiK*-Gens aus *S. lividans* als DIG-markierte Sonde in DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten wurde in chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. 50/110 ein Leserahmen identifiziert, dessen abgeleitetes Genprodukt die charakteristischen Kriterien eines ABC-Proteins der CUT1-Familie zeigte (SCHÄFER, 1999). Das ebenfalls als *msiK* bezeichnete Gen wurde in geeignete Vektoren kloniert und in verschiedenen *E. coli*-Stämmen exprimiert (SCHÄFER, 1999; ELVERS, 2002). Wie auch für das Acarbose-Bindeprotein AcbH beobachtet, resultierte die heterologe Synthese von (His)₆-MsiK stets in einer Anreicherung aggregierten Proteins (Abbildung 6.21A). Bemühungen im Hinblick auf eine Erhöhung des löslichen Anteils von MsiK (exprimiert von pDE03, *msiK* auf pQE9) führten ebenso zu keinem Erfolg. Dabei wurden einige der für AcbH beschriebenen Strategien getestet (s. Abschnitt 6.4.1) und darüber hinaus auch Ko-Synthesen mit den Chaperonen DnaK, DnaJ und GrpE (CASTANIÉ *ET AL.*, 1997) sowie eine Ko-Induktion chromosomal kodierter Chaperonsysteme durch 2 % Ethanol. Außerdem wurde nach MAR CARRIÓ & VILLAYERDE (2000) versucht, aggregiertes MsiK durch Abbruch der Proteinbiosynthese in dem Expressionsstamm *E. coli* JM109 nach Zugabe von Chloramphenicol zu remobilisieren. Nachdem mit dem nur dürftig im Cytosol vorliegenden (His)₆-MsiK Reinigungsversuche über Ni-Affinitätschromatographie durchgeführt und bezüglich Ausbeute und Reinheit als unzufriedenstellend bewertet wurden, erfolgte die Reinigung unter denaturierenden

Bedingungen. Das MsiK-Protein konnte nach Solubilisierung aus dem LSP mit 8 M Harnstoff in hinreichenden Mengen erhalten und durch schnelles Ausverdünnen des Denaturierungsmittels renaturiert werden (Abbildung 6.21B). Die im Rahmen der Charakterisierung von MsiK in einem ersten Versuch durchgeführten ATPase-Aktivitätsmessungen zeigten allerdings keine ATPase-Aktivität des Proteins. Als naheliegendste Ursache hierfür wurde die Möglichkeit einer größtenteils inkorrekten Rückfaltung diskutiert.

Des Weiteren wurde für die Gewinnung eines polyklonalen Anti-MsiK-Antiserums das Antigen MsiK analog der für AcbH beschriebenen Methode unter 5.7.5 aus Polyacrylamid-Gelen eluiert.

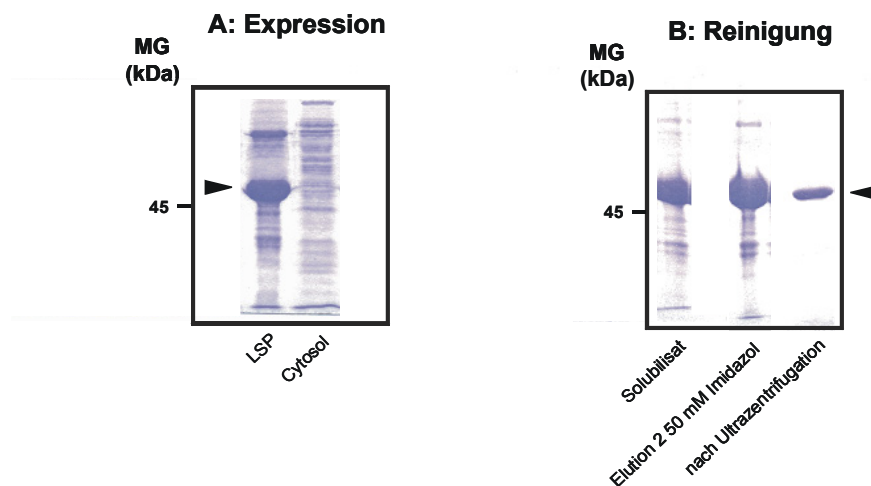


Abbildung 6.21: Nachweis der heterologen Synthese von MsiK in *E. coli* JM109 <pDE03> sowie denaturierende Reinigung und Renaturierung (verändert nach ELVERS, 2002). Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Die Lokalisation des (His)₆-MsiK (40,8 kDa) ist mit einem schwarzen Pfeilkopf (◄) markiert. **A:** Zum Vergleich wurden je 30 µg der Proteine des LSPs und der Cytosolfraction untersucht. **B:** Für die Reinigung von (His)₆-MsiK wurden 5 mg LSP mit 8 M Harnstofflösung für 30 Minuten solubilisiert. Nach Ultraschallbehandlung wurde das Solubilisat (8 ml) mit 1 ml Ni-NTA-Matrix inkubiert. Im Anschluss an Waschungen mit 10 Säulenvolumina Puffer wurde das Protein mit 50 mM Imidazol eluiert. Jeweils 15 µl der einzelnen Proben wurden untersucht. Die anschließende Renaturierung erfolgte durch schnelles Ausverdünnen (1 : 50) des Denaturierungsmittels. Nach 45 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Volumen des Ansatzes eingeeengt, durch abschließende Ultraschallbehandlung konnte das im Überstand befindliche lösliche MsiK-Protein nach einer Umlagerung in einen geeigneten Messpuffer für die ATPase-Aktivitätsmessungen genutzt werden. Weitere Details sind der Originalarbeit zu entnehmen.

6.6.2 Heterologe Ko-Synthese und Reinigung des Komplexes AcbFG-MsiK₂

Für eine sichere Charakterisierung eines Transportsystems ist es unerlässlich, den vollständigen Komplex in der definierten Umgebung von Proteoliposomen zu rekonstituieren. Als Voraussetzung dafür muss es gelingen, die Membranproteine in Solubilisierungsverfahren aus den Ursprungsmembranen herauszulösen und zu reinigen. Gleichzeitig können im

Rahmen der Reinigung durch Ko-Elutionsstudien Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen gefunden werden.

Indizien für eine Interaktion der Membranproteine AcbFG mit dem ABC-Protein MsiK zeigten sich in Wachstumsversuchen, da die toxische Wirkung der Synthese der Membrankomponenten, die zu einer Stagnation des Kulturwachstums führte, durch Ko-Expression des *msiK*-Gens zum Teil aufgehoben wurde (SCHÄFER, 1999). Dieser Befund wurde von ELVERS (2002) bestätigt und durch Ko-Elutionsstudien weiter unterstützt. Dafür wurde mit einem zwei-Plasmid-System in *E. coli* JM109 <pGEO4, pGEO7> gearbeitet, das *acbFG* von pQE9 und *msiK* von pSU18 ko-exprimiert. AcbF wurde dabei N-terminal mit einem (His)₆-Tag fusioniert, über den in Immunoblots mit Anti-RGS-Antiserum dieses Membranprotein detektiert werden konnte. Da die Synthese von AcbFG vermutlich translational gekoppelt ist, wurde auch von einer AcbG-Synthese ausgegangen. Das MsiK-Protein hingegen lag unfusioniert vor.

Die sich nach einer Solubilisierung der Membranproteine mit 1,1 % Dodecyl- β -D-maltosid und anschließender Reinigung des Komplexes über eine Ni-Säule in den Eluatfraktionen befindenden Proteine AcbF und MsiK konnten in einem Immunoblot detektiert werden (Abbildung 6.22). Die Darstellung der Prozedur in einer SDS-PAGE sagte allerdings aus, dass für eine Rekonstitution des AcbFG-MsiK₂-Komplexes die Reinigung optimiert werden muss, da zahlreiche weitere Proteine in den Eluaten enthalten waren.

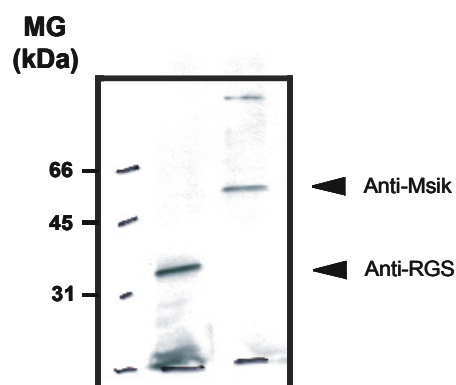


Abbildung 6.22: Ko-Elution des Komplexes AcbFG-MsiK₂ (verändert nach ELVERS, 2002). Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der immunologische Nachweis des (His)₆-AcbF (39,1 kDa) wurde mit Anti-RGS-Antiserum, der des MsiK (39,2 kDa) mit Anti-Msik-Antiserum geführt. Die Detektion des MsiK zusammen mit AcbF erfolgte in unabhängigen Immunoblot-Analysen. Weitere Details sind der Originalarbeit zu entnehmen.

6.7 Immunochemische Analyse des Syntheseprofils von AcbH und MsiK in *Actinoplanes* sp.

Für die ebenfalls im Acarbose-Biosynthesegencluster codierten extrazellulären Proteine AcbE (α -Amylase) und AcbD (Acarviosyl-Transferase) wurden Kultivierungsbedingungen ermittelt, die eine Synthese dieser Enzyme induzieren (STRATMANN, 1997) (s. Abschnitte 4.1 und 4.2.4). Dabei konnten Maltose und Maltotriose, insbesondere im Acarbose-Produktionsmedium, als Moleküle mit solch einer Wirkung identifiziert werden. Diese Untersuchungen wurden mit Zellen aus dreitägiger Anzucht unternommen. Wie auch für den Maltosetransport beschrieben (s. Abschnitt 6.2.2), hatte der Zusatz von Glukose keinen reprimierenden Effekt im Sinne einer Katabolitrepression.

6.7.1 Das Syntheseprofil von AcbH

Um nun die Synthesevoraussetzungen für ein weiteres Protein aus dem *acb*-Gencluster, nämlich AcbH, aufzuklären und in einen Kontext mit dem Modell des Acarbose-Metabolismus zu bringen, wurden Zellen von *Actinoplanes* sp. mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Acarbose-Produktionsmedium, TSB-Vollmedium und Minimalmedium mit je 0,5 % Maltodextrinen MD, MD50, Maltose, Acarbose, Glukose und Glycerin) angezogen. Während des Wachstums (nach 24, 48 und 72 Stunden) wurden Proben entnommen, in die Zellbestandteile fraktioniert (s. 5.7.1) und Western Blot-Analysen mit Anti-AcbH-Antiserum (s. 5.7.6) unterzogen. Für sämtliche Analysen wurden jeweils 30 μ g Protein eingesetzt

Abbildung 6.23 zeigt, dass die Synthese von AcbH (44,5 kDa ohne Lipidmodifizierung) nach 24 stündigem Wachstum immunologisch noch nicht nachzuweisen war. Hingegen waren zwei prominente Proteinbanden im Kulturüberstand zu finden, die aufgrund ihrer Größe als AcbE (107 kDa) und AcbD (76 kDa) benannt werden könnten (entsprechende Antiseren stehen nicht zur Verfügung). Dieser Befund lies auf eine unterschiedliche Regulation der Synthese schließen.

Bestätigt und sogar noch erweitert wird diese Spekulation durch das Bild bei Wachstum der Zellen von zwei bzw. drei Tagen mit 0,5 % Maltodextrinen (Abbildung 6.24). Es scheint als würden auch AcbE und AcbD unabhängig voneinander reguliert. In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass nach zweitägiger Anzucht nur AcbD und weder die α -Amylase noch das

Bindeprotein vorhanden waren. Wiederum unabhängig wurde das Protein AcbH nur von drei Tage alten Zellen produziert.

Wachstum in Acarbose Produktionsmedium

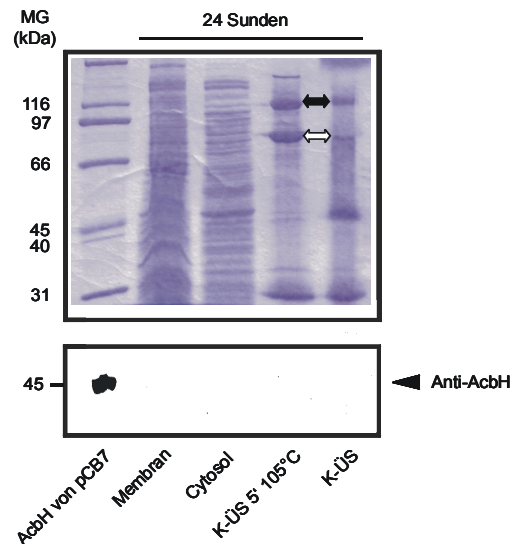


Abbildung 6.23: Expression von wt-*acbH* in *Actinoplanes* sp. bei Anzucht in Acarbose-Produktionsmedium. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen (oberes Bild) und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet (unteres Bild). Der immunologische Nachweis des wt-AcbH mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. Als Blotkontrolle diente das (His)₆-AcbH von pCB7 (45,8 kDa). Das Protein AcbD ist durch einen weißen, das Protein AcbE durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Wachstum in 0,5 % Maltodextrinen

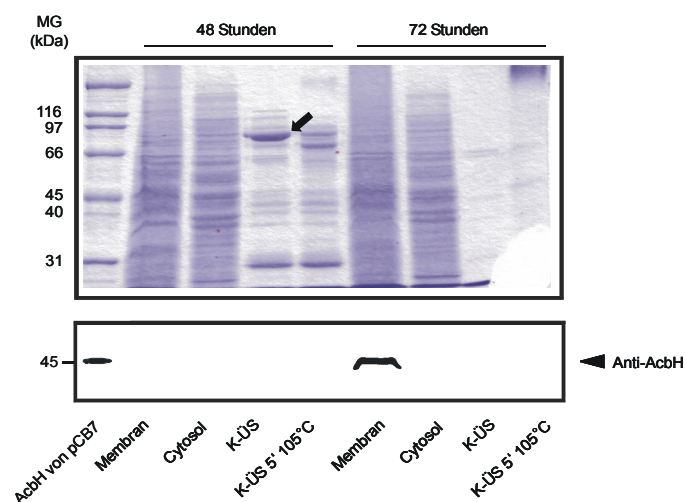


Abbildung 6.24: Expression von wt-*acbH* in *Actinoplanes* sp. bei Anzucht in 0,5 % Maltodextrinen. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen (oberes Bild) und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet (unteres Bild). Der immunologische Nachweis des wt-AcbH mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. Als Blotkontrolle diente das (His)₆-AcbH von pCB7 (45,8 kDa). Das Protein AcbD ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Da, wie auch in Abbildung 6.24 zu sehen, die Lokalisation von AcbH auf die Membranen beschränkt war und des weiteren frühestens (unter den gewählten Erntezeitpunkten) nach 48 stündiger Kultivierung detektierbar, wurden für die Abbildung 6.25 alle weiteren Induktionsmuster geschmälert zusammengefasst.

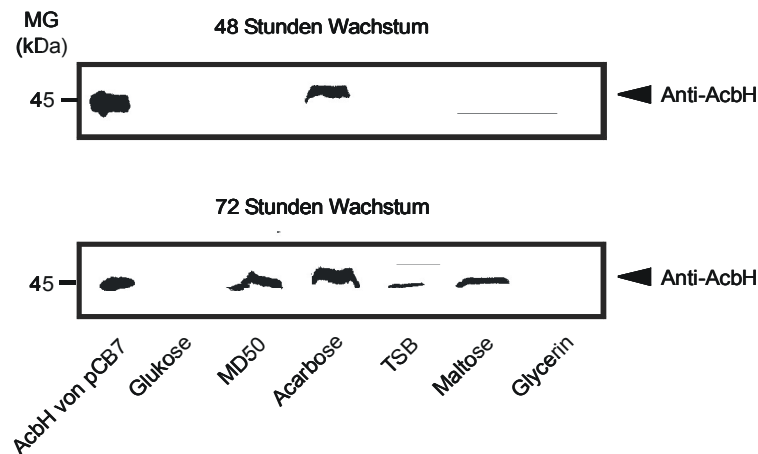


Abbildung 6.25: Expression von wt-*acbH* in *Actinoplanes* sp. bei Anzucht mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Vollmedium TSB und Minimalmedium mit je 0,5 % Glukose, MD50, Acarbose, Maltose und Glycerin. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der immunologische Nachweis des wt-AcbH mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. Als Blotkontrolle dienten ca. 0,1 µg des (His)₆-AcbH von pCB7 (45,8 kDa).

Die Kohlenstoffquellen Glukose und Glycerin führten nicht zu einer Produktion von AcbH. Überraschenderweise führte jedoch Acarbose zur ausgeprägtesten Synthese des Bindeproteins, und zwar gegenüber allen anderen getesteten Substraten schon nach zwei Tagen Kultivierung der Zellen. Ebenfalls eine Wirkung auf die Expression von *acbH* hatten, nach dreitägiger Anzucht, die für die Expression von *acbD* und *acbE* beschriebenen Zucker Maltose und Maltotriose. Der hier erbrachte Nachweis einer AcbH-Synthese in Vollmedium TSB (enthält 0,25 % Glukose und Maltose) nach drei Tagen spiegelt, wie schon bei den Transportexperimenten unter 6.2.2 und für AcbD und AcbE (STRATMANN, 1997) gefunden, keine Glukoserepression wider. Das von den Zellen produzierte AcbH lag in quantitativer Hinsicht stets weit unter dem Level der beiden extrazellulären Enzyme, welche zu allen drei Erntezeitpunkten (Abbildungen 6.23 und 6.24 sowie STRATMANN, 1997) bereits in Coomassie-Blue –gefärbten SDS-Gelen deutlich sichtbar waren.

Unterstützend für die hier dargebrachten Ergebnisse sind Analysen auf mRNA-Basis. Transkripte von *acbH* sind ebenfalls in nur geringen Mengen und erst nach zwei bis drei Tagen nachzuweisen (U. Wehmeier, pers. Mitteilung).

Um die Befunde einer Lokalisation des AcbH in den Membranen von *Actinoplanes* sp. zu unterstützen und einen falsch positiven Befund durch Pelletierung aggregierten Proteins auszuschließen, wurde versucht, das wt-Protein aus Membranen von Zellen nach Kultivierung mit 0,5 % Acarbose mit 1,1 % des Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) zu solubilisieren (s. 5.7.15). Die Abbildung 6.26 stellt dar, dass unter den gewählten Bedingungen das gesamte in den Membranen enthaltene Protein herausgelöst werden konnte. Einen gleichwertigen Effekt erzielte auch die Verwendung von 0,1 % des Detergenz TritonX-100 (nicht gezeigt).

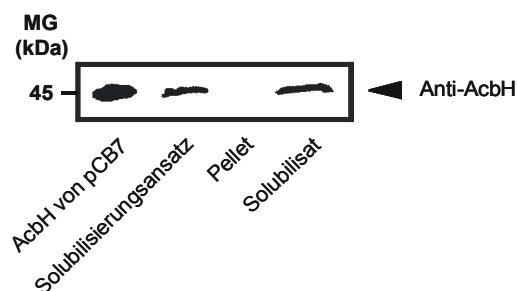


Abbildung 6.26: Solubilisierung des wt-AcbH aus Membranen von *Actinoplanes* sp. Die einzelnen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der immunologische Nachweis des wt-AcbH mit Anti-AcbH-Antiserum (◄) wurde durch Detektion der Chemilumineszenz geführt. Als Blotkontrolle diente das (His)₆-AcbH von pCB7 (45,8 kDa). Der Solubilisierungsansatz enthielt Membranen mit 390 µg Proteinanteil. Nach einer 40minütigen Inkubation unter vorsichtigem Rühren auf Eis wurde der Ansatz ultrazentrifugiert, das Solubilisat vom Pellet getrennt und dieses im Ausgangsvolumen Solubilisierungspuffer (1,1 % Dodecyl- β -D-maltosid (DDM), 5 % Glycerin, 0,1 mM PMSF in Minimalmedium MNS) resuspendiert.

Erste Reinigungsversuche über Anionen-Austauschmatrix (DEAE-Sepharose), bei einem für AcbH errechneten pI von 5,2 unter pH-Bedingungen von 7,5 durchgeführt, hatten leider keinen Erfolg.

6.7.2 Das Induktionsprofil von MsiK

Die Wachstumsexperimente sowie die Ko-Elutionsstudien aus Abschnitt 6.6.2 gaben Hinweise darauf, dass das ABC-Protein MsiK möglicherweise dem Transportsystem AcbHFG als energetisierende Domäne assistiert. So wurden in Zusammenarbeit mit D. ELVERS (2002) die Zellfraktionen auch auf Vorhandensein von MsiK mit Anti-MsiK-Antiserum überprüft, zu dieser Zeit allerdings lediglich aus Kulturen nach 24 stündiger Anzucht. Dabei wurden zusätzlich Fraktionen von Zellen nach Wachstum in Minimalmedium mit 0,5 % Cellobiose untersucht, da das homologe, multiple ABC-Protein MsiK aus *S. lividans* den Maltose- und den Cellobiosetransporter bedient.

Die Synthese von MsiK war unabhängig vom Wachstumszucker in allen getesteten Kulturen in etwa gleichen Mengen nachzuweisen, und zwar überwiegend in den Membranen und zu einem geringen Anteil im Cytosol. Dieses Induktionsprofil deckt sich nicht mit dem des Zucker-Bindeproteins AcbH, welches weder nach 24 Stunden Kulturwachstum noch bei Anzucht der Zellen mit Glukose oder Glycerin detektierbar war. Die vorwiegende Lokalisation des betrachteten Proteins in den Membranen deutet auf eine Assoziation an membranintegrale Komponenten eines Transportkomplexes.

6.7.3 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung des im Acarbose-Biosynthese-Genclusters kodierten, Bindeprotein-abhängigen ABC-Importsystems AcbHFG wurden die entsprechenden Gene heterolog in *E. coli* und *S. lividans* exprimiert und z. T. gereinigt.

Während in *S. lividans* nur eine schwache Synthese des AcbH-Proteins beobachtet wurde, konnte in *E. coli* eine starke Anreicherung erzielt werden. Da das (His)₁₀-Fusionsprotein hier in aggregierter Form vorlag, wurde es unter denaturierenden Bedingungen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend renaturiert. Durch die Aufnahme eines CD-Spektrums wurde eine α -helikale Konformation des renaturierten Proteins nachgewiesen. In Substratbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz konnte eine Interaktion von AcbH mit Acarbose und längerkettigen Derivaten, nicht jedoch mit Maltose, Maltodextrinen und Saccharose gezeigt werden.

Durch Immunoblot-Analysen mit Anti-AcbH-Antiserum wurde das Syntheseprofil des Bindeproteins in *Actinoplanes* sp. untersucht. AcbH wurde nur bei Zellen aus der stationären Wachstumsphase detektiert, denen Acarbose oder Maltose/Maltodextrine als Kohlenstoffquelle angeboten wurden. Dem vorhergesagten Lipoprotein-Charakter entsprechend wurde eine ausschließliche Lokalisation in den Membranfraktionen festgestellt.

Im *acb*-Gencluster ist kein Gen für ein ABC-Protein kodiert, das den Komplex AcbFG komplettiert. Durch SCHÄFER (1999) wurde das Gen einer möglicherweise assistierenden ABC-Domäne (MsiK) identifiziert. In Ko-Expressions- und Ko-Elutionsstudien (ELVERS, 2002) konnten Hinweise auf eine Komplexbildung der Membranproteine AcbFG mit MsiK erhalten werden. Die im Gegensatz zu AcbH konstitutive Synthese von MsiK erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf die Zusammengehörigkeit der Komponenten in *Actinoplanes* sp..

7 DISKUSSION

7.1 Wirkung von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von *Escherichia coli* K12 und resultierende Konsequenzen für das Modell zum Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp.

Angeregt durch die strukturelle Ähnlichkeit des Pseudotetrasaccharids Acarbose zu dem natürlichen Substrat Maltotetraose des Enterobakteriums *Escherichia coli* K12, wurde der Einfluss des α -Glukosidase-Hemmers auf einzelne Komponenten des Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsels differenzierend untersucht. Die so erzielten Befunde sollten in das zu Beginn dieser Arbeit bestehende Modell zum Acarbose-Metabolismus integriert werden (s. Seite 9, Abschnitt 4.1).

7.1.1 Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von *Escherichia coli* K12

Bisherige Studien zur Wirkung von Acarbose beschränkten sich auf Untersuchungen zu Interaktionen mit vornehmlich extrazellulären und intestinalen Enzymen diverser pro- und eukaryotischer Organismen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des Pseudotetrasaccharids auch auf das Verhalten intakter Zellen von *E. coli* K12 in Kultur ausgeweitet. Nachfolgend wurde der Einfluss von Acarbose auf einige der Komponenten, die an Substraterkennung bzw. -transport und Substratverwertung während des Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsels beteiligt sind, differenziert.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass radioaktiv markierte Acarbose (nur die C-Atome des Acarviosyl-Restes sind durch das ^{14}C -Isotop substituiert) in Zellen von *E. coli* aufgenommen wird und dass dieser Import bei Anwesenheit von Maltose inhibiert ist (s. 6.1.1). *E. coli* synthetisiert eine periplasmatische α -Amylase MalS (SCHNEIDER *ET AL.*, 1992), die gegenüber Acarbose bis zu einer Konzentration von 0,1 mM insensitiv ist (Spiess & Ehrmann, pers. Mitteilung). MalS katalysiert die Abspaltung von Maltohexaosen aus längerkettigen Dextrinen. Daher kann angenommen werden, dass unter den experimentellen Bedingungen der Transportmessungen (5,7 μM radioaktive Acarbose) keine Hydrolyseprodukte sondern Acarbose selbst transportiert wird. Zusammen mit den Ergebnissen einer Diplomarbeit (BRUNKHORST, 1998) lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Acarbose ein Substrat des Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportsystems MalEFGK₂ ist. Bereits hier konnte dokumentiert werden, dass Acarbose spezifisch sowohl das Wachstum von

E. coli K12 mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle als auch den Maltoseimport hemmt.

Zunächst wurde erwogen, dass Acarbose durch das periplasmatische Maltose-Bindeprotein MalE als Substrat erkannt wird. In Fällungsexperimenten mit MalE-haltigen Osmoschock-Überständen und [U-¹⁴C]-Maltose bei Anwesenheit von Acarbose konnte diese Spekulation bestätigt werden (s. 6.1.2). Beide Zucker konkurrieren um die Bindetasche des MalE. Für das grampositive Bakterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* wurde ebenfalls eine Hemmung des Maltose-Transports und der [U-¹⁴C]-Maltose-Bindung an das Maltose-Bindeprotein MalE durch Acarbose beschrieben (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000).

Das Wachstum einer Bindeprotein-unabhängigen Mutante (*malF500*, TREPTOW & SHUMAN, 1985) auf Maltose war durch Acarbose weniger beeinträchtigt (BRUNKHORST, 1998). Die Eigenschaft solcher Mutanten liegt neben anderen darin, dass sie nur Maltose ($K_m = 2 \text{ mM}$), aber keine Maltodextrine transportieren (TREPTOW & SHUMAN, 1985). In diesem Fall ist die Substratspezifität durch die Membranproteine MalFG bestimmt (MERINO & SHUMAN, 1997; s. auch Seite 17, Abschnitt 4.2.3.1). Als weitere am Import beteiligte Komponente ist auch das Maltoporin in der äußeren Membran von *E. coli* ein Angriffspunkt der Acarbose (BRUNKHORST *ET AL.*, 1999).

Der Befund, dass durch 100 μM Acarbose die Bindung von Maltose an MalE zu 75 %, der Maltose-Transport jedoch zu fast 100 % gehemmt wurde, spiegelt die Summierung der aufgeführten, unabhängigen Interaktionen des Pseudotetrasaccharids mit den an der Substraterkennung beteiligten Bausteinen des Maltose-Transportsystems wider. Das Wachstum der Zellen von *E. coli* K12 wird erst bei fünffach höheren Acarbose-Konzentrationen deutlich gehemmt (BRUNKHORST, 1998). Hier sind bei der zur Kultivierung angebotenen Menge an Maltose (13,8 mM) die unspezifischen Porine OmpF und OmpC für eine Substratversorgung ausreichend, während unter den Bedingungen der Transportmessungen mit 5,7 μM Maltose das Maltoporin beteiligt ist. Insgesamt deuten die Ergebnisse an, dass die N-glykosidische Bindung des Acarviosyl-Restes der Acarbose, welche die inhibitorische Wirkung auf Hydrolasen determiniert (s. Seite 10, Abschnitt 4.1), keine Relevanz für den Transportvorgang hat und Acarbose bis hierher strukturell als Maltotetraose betrachtet wird.

Zellen von *E. coli* K12 vermögen nicht mit Acarbose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Bei Ko-Kultivierung der Zellen mit Glycerin und Acarbose jedoch konnte in Immunoblot-Analysen eine erhöhte Synthese des Maltose-Bindeproteins MalE festgestellt werden (BRUNKHORST, 1998). Das erreichte Induktionslevel erwies sich allerdings als unzureichend für den Nachweis jeglicher Transportaktivität. Da für die Induktion des Maltoseregulons die Aktivierung des positiven Regulators MalT durch Maltotriose essentiell ist (BOOS & SHUMAN, 1998; s. Seite 21, Abschnitt 4.2.4), müssen Hydrolyseprodukte der Acarbose als Effektoren gewirkt haben. Unter Schlussfolgerung, dass Acarbose möglicherweise auch von den cytoplasmatischen Enzymen des Maltodextrin-Katabolismus als Substrat erkannt und umgesetzt wird sowie dem Interesse folgend, den Verbleib der intrazellulär akkumulierten Acarbose nachzuvollziehen, wurden Experimente zur Quantifizierung freigesetzter Glukose mit Ganzzellextrakten durchgeführt (s. 6.1.3). Sowohl die Amylomaltase MalQ als auch die Maltodextrin-Glukosidase MalZ von *E. coli* hydrolysieren α -1,4-glykosidische Bindungen von Maltodextrinen (BOOS & SHUMAN, 1998) und sind damit potentiell durch Acarbose beeinflussbar (Abbildung 7.1; s. auch Seite 18, Abschnitt 4.2.3.1).

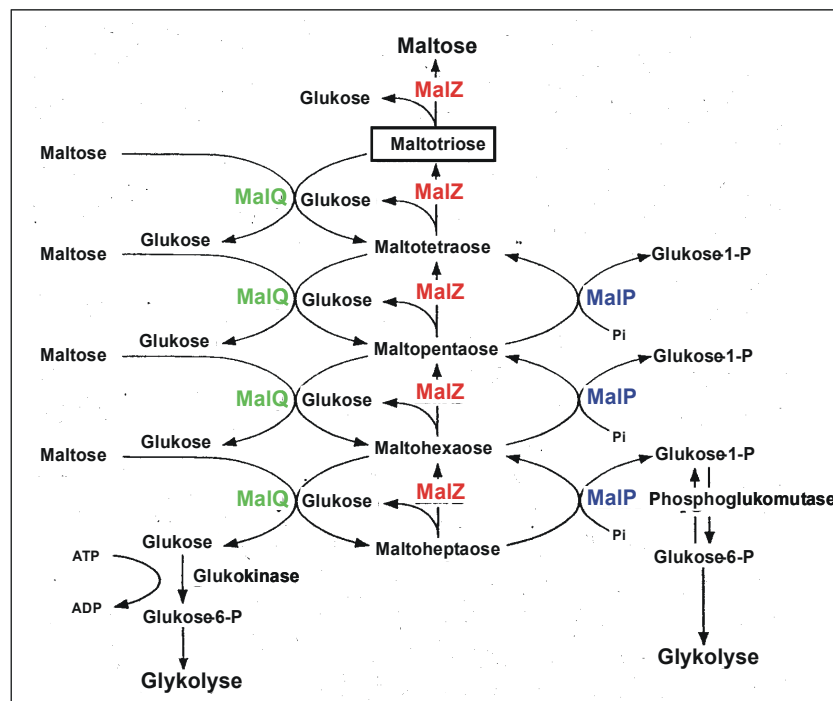


Abbildung 7.1: Maltodextrinabbau durch die zytoplasmatischen Enzyme MalQ, MalP und MalZ (verändert nach BOOS & SHUMAN, 1998). Die drei Enzyme sind farbig wiedergegeben: MalQ: Amylomaltase, MalZ: Maltodextrin-Glukosidase, MalP: Maltodextrin-Phosphorylase. Aus diesem Schema wird deutlich, dass der Abbau von Maltose nur in Gegenwart eines Maltosyl-Donors (Minimum Maltotriose) stattfinden kann.

In Ganzzellextrakten des *E. coli* Stammes CB39 (*malQ malZ*⁺) konnte eine geringe Menge freier Glukose, entlassen aus Acarbose durch die Aktivität der Maltodextrin-Glukosidase, nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte auf das Induktionspotential einer aus Acarbose resultierenden Pseudotriose hinweisen. Damit würde auch das Aktivatorprotein MalT einen Pseudozucker als Substrat erkennen. Möglicherweise ist auch eine aus den Glukoseeinheiten formierte Maltotriose durch ein bisher hypothetisches Enzym (EHRMANN & BOOS, 1987; DECKER *ET AL.*, 1993) der Induktor der Expression des *malE*-Gens. Um die chemische Natur des Induktors zu verifizieren, sollte das Syntheseelevel des MalE-Proteins nach Ko-Kultivierung des Stammes TK38 (*malQ*⁺ *malZ*) mit Glycerin und der Pseudotriose Komponente 2 (Acarviosyl-1,4-Glukose; vgl. Tabelle 6.2 auf Seite 77) überprüft werden. Mit diesem Stamm konnte eine Degradation der Acarbose durch die Amylomaltase nicht festgestellt werden. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass Acarbose auch nicht von der ebenfalls in den verschiedenen Ganzzellextrakten enthaltenen MaltodextrinPhosphorylase MalP als Substrat erkannt wird. MalP katalysiert die Freisetzung von Glukose-1-Phosphat aus Maltopentaose und längerkettigen Maltodextrinen durch Phosphorolyse. Ob Acarbose hier, wie im Falle der Glykogen-Phosphorylase (GOLDSMITH *ET AL.*, 1987), als Inhibitor wirkt, bleibt offen.

Entgegen der Feststellung, dass Acarbose allein nicht durch die Amylomaltase hydrolysierbar ist, konnte in Gegenwart von überschüssiger Maltose als Maltosyl- oder Pseudomaltotriosylakzeptor jedoch ein Umsatz von Acarbose als Glykosyl- oder Maltosyldonor durch MalQ bestimmt werden. MalQ transferiert Maltosyl- und Dextrinylreste auf das nicht reduzierende Ende eines Akzeptormoleküls (BOOS & SHUMAN, 1998). Anders als die oben aufgeführte Deutung, dass die N-glykosidische Bindung des Acarviosyl-Restes der Acarbose keine Relevanz für den Transportvorgang hat, verhindert diese Struktur des Acarviosins am nicht reduzierenden Ende der Acarbose dagegen einen enzymatischen Umsatz, da sie keine Akzeptorfunktion einnehmen kann. Dies ist anders bei der Cyclomaltodextrin-Glukanyltransferase (CGTase) aus *Bacillus macerans*. Ähnlich MalQ und MalZ sind auch CGTasen durch Acarbose hemmbar (STROKOPYTOV *ET AL.*, 1995), das Enzym von *B. macerans* nutzt aber trotzdem das nicht reduzierende Ende der Acarbose als Empfänger für Maltohexaose (YOON & ROBYT, 2002).

Die lediglich durch die Aktivität von MalZ zur Verfügung stehenden Glukosemoleküle waren insgesamt nicht ausreichend, Wachstum von *E. coli* K12 mit Acarbose als einziger

Kohlenstoffquelle zu ermöglichen. Im Gegenteil, der überwiegende Anteil der importierten Acarbose wird nicht abgebaut und führt durch Akkumulation zu einem cytotoxischen Effekt ähnlich der Anhäufung von Maltose in *malQ*-Mutanten (BOOS & SHUMAN, 1998).

Im Hinblick auf den Einsatz von Acarbose als Wirkstoff zur Behandlung des Diabetes mellitus, begleitet von einer stärkehaltigen Diät, muss neben der pharmakokinetischen und therapeutischen Eigenschaft dieser Substanz auch der Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora des Patienten von Bedeutung sein. Für das Darmbakterium *E. coli* konnte eine spezifische Hemmung des Wachstums mit Maltose belegt werden, die bei Acarbose-Konzentrationen über 0,5 mM sogar zu einer Lyse der Zellen führte. Dies betrifft sicherlich auch andere Mikroorganismen des Intestinaltraktes. Daher wäre es von therapeutischem Interesse, die Entwicklung der Darmflora unter Acarboseanwendung zu verfolgen.

7.1.2 Bedeutung der Befunde für den Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp.

Die von STRATMANN (1997) formulierte Hypothese zur Bedeutung von Acarbose im Ökosystem von *Actinoplanes* sp. beschreibt einen intra- und extrazellulären Acarbosekreislauf, der gemeinsam mit den Aktivitäten der extrazellulären α -Amylase AcbE und der Acarviosyl-Transferase (ATase) AcbD der Erschließung von Kohlenstoffquellen dient. Dabei soll die Acarbose neben der Carbophor-Funktion auch eine Rolle als Inhibitor von maltolytischen Enzymen von Nahrungskonkurrenten übernehmen (s. Seite 12, Abschnitt 4.1).

Dieses zu Beginn der vorliegenden Arbeit bestehende Modell zur Bedeutung von Acarbose warf Fragen auf, die nun beantwortet werden können (s. auch Seite 109, Abschnitt 7.3.3). Trotz der Funktion von Acarbose als Inhibitor maltolytischer Enzyme von Nahrungskonkurrenten würden die im Habitat vorkommenden Mikroorganismen anderer Arten ausreichend mit den Produkten einer Stärkehydrolyse versorgt, nämlich durch die Aktivität von AcbE. So kann allein die Inhibition von Exoenzymen konkurrierender Bakterien oder Pilze keine befriedigende Erklärung zur Rolle von Acarbose liefern. Effektiver für *Actinoplanes* sp. wäre ein Inhibitionsmechanismus, der auch die Maltose/Maltodextrin-Transportsysteme und den dazugehörigen Katabolismus von Nahrungskonkurrenten betrifft.

Abgeleitet aus den Ergebnissen dieser Arbeit, kann die Hypothese zur Funktion von Acarbose im natürlichen Habitat um diesen Aspekt erweitert werden. Die Befunde zum Einfluss von Acarbose auf den Maltose/Maltodextrin-Stoffwechsel von *Escherichia coli* sollten auch auf andere Mikroorganismen mit Stärke-Metabolismus übertragbar sein. Schließlich reicht das Spektrum der durch Acarbose und seine längerkettigen Derivate inhibierten Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen von intestinalen α -Glukosidasen wie Glukoamylasen, Saccharasen und Maltasen bis zu extrazellulären α -Glukosidasen und α -Amylasen verschiedener Pilze und Bakterien wie *Saccharomyces* sp. und *Bacillus subtilis* (TRUSCHEIT ET AL., 1981; MÜLLER, 1989). Der Vorteil, den sich *Actinoplanes* sp. durch den sehr energieaufwendigen Acarbose-Metabolismus verschafft, beruht also wahrscheinlich auch auf der Inhibierung der Aufnahmesysteme für Maltose und Maltodextrine. Möglicherweise geschieht dies so wie bei *E. coli* durch effektiven Import von Acarbose, der zu einer Wachstumsbeeinträchtigung bis hin zur Lyse der Zellen führen kann. Neben dem dadurch entstehenden Defizit im Energiehaushalt des Nahrungskonkurrenten aufgrund eines Mangels an Maltooligosacchariden, die für den Katabolismus bereit stehen sollten, könnte die intrazelluläre Akkumulation von Acarbose auch toxische Effekte haben. Im Fall von *E. coli* werden die cytoplasmatischen Enzyme MalQ und MalZ nur leicht in ihrer Aktivität gehemmt, Acarbose selbst wird nur schwach als Substrat erkannt und reichert sich im Cytosol an. Ein zu Hydrolyseprodukten der Stärke alternatives Wachstum mit dem Pseudotetrasaccharid ist nicht möglich.

Möglicherweise entsteht eine hemmende Wirkung von Acarbose und seinen Derivaten auch ohne tatsächlichen Import, sondern lediglich durch eine Art Verstopfung der Translokationspore. Dies könnte durch eine Interaktion mit dem Substrat-Bindeprotein realisiert werden, die nicht zur Initiation des Transportvorganges führt (s. auch Seite 15, Abschnitt 4.2.2). Einen solchen Einfluss zeigt z. B. die Bindung von β -Cyclodextrinen an das Maltose-Bindeprotein von *E. coli*. Ein Transport dieser Substanz findet nicht statt (HALL ET AL., 1997a; 1997b; 1997c), da sie nicht in der Lage ist, die geschlossene Konformation des MBP zu induzieren. Dabei entspricht die Bindungsaffinität derjenigen für Maltose und Maltotriose (THOMSON ET AL., 1998). Für den Maltosetransport in Zellen von *Alicyclobacillus acidocaldarius* konnte ebenfalls eine Hemmung durch Acarbose belegt werden. Dabei kompetitiert Acarbose mit Maltose um die Bindung an das Maltose-Bindeprotein MalE (HÜLSMANN ET AL., 2000). Ein tatsächlicher Import von Acarbose wurde hier nicht untersucht.

7.2 Charakterisierung des Maltose/Maltotriose-Transports bei *Actinoplanes* sp.

Während der Suche nach effizienten Acarbose-Produktionsstämmen, abgeleitet von *Actinoplanes* sp. SE50, zeigte sich, dass der Maltose- und Maltodextringehalt des Kulturmediums die Produktivität determiniert (FROMMER *ET AL.*, 1975; FROMMER *ET AL.*, 1977a; 1977b; RAUENBUSCH & SCHMIDT, 1987). Die kommerzielle Acarbose-Fermentation (Bayer AG, Wuppertal) benötigt hoch konzentriertes (10 % oder mehr) Stärkehydrolysat. Des weiteren gibt es Evidenzen für eine positive Beeinflussung durch Maltose und Maltodextrine aufgrund des Vorkommens einer Konsensus-Sequenz und einer möglichen MalT-Box in den Promotorbereichen einiger der Schlüsselgene der Acarbose-Biosynthese. Solche Sequenzen wurden auch in den regulatorischen Regionen von Genen des Stärke- bzw. Maltose-Stoffwechsels verschiedener anderer Bakterien identifiziert, z. B. bei *malP* aus *E. coli* oder *malE* aus *S. coelicolor* (SCHWARTZ, 1987; VAN WEZEL *ET AL.*, 1997b; STRATMANN, 1997; s. auch Seite 21, Abschnitt 4.2.4).

Diese Befunde und das unter anderem darauf aufbauende Modell des Acarbose-Metabolismus fordern Aufnahmesysteme sowohl für Maltose und/oder Maltodextrine als auch für Acarbose und/oder die längerkettigen Homologe. Von STRATMANN (1997) wurde eine Beteiligung des im *acb*-Gencluster vertretenen ABC-Transporters AcbHFG diskutiert. Die Charakteristik des Maltose-, Maltotriose- und Acarbose-Transports in Zellen von *Actinoplanes* sp. sollte einen weiteren Aspekt zum Verständnis des Acarbose-Metabolismus liefern (s. auch Seite 109, Abschnitt 7.3.3). Ein Modell der gefundenen Transportkapazitäten ist in Abschnitt 7.2.3 beschrieben.

7.2.1 Die Transportaktivitäten von *Actinoplanes* sp.

Zunächst wurde die **generelle Fähigkeit der Zellen zum Maltose- und Maltotriose-Transport** in Abhängigkeit von der zur Kultivierung angebotenen Kohlenstoff-Quelle überprüft (s. Abbildungen 6.6 und 6.9). Es zeigte sich überraschenderweise, dass die Transportraten in Zellen aus Anzuchten in Acarbose-Produktions-Medium oder anderen Maltose/Maltodextrin-haltigen Nährmedien relativ am niedrigsten waren. Höhere Raten erzielten die Zellen nach Wachstum in Saccharose und Trehalose. Die effizienteste Maltose- und Maltotriose-Transportaktivität wiesen Zellen aus Acarbose- und Glycerin-Kulturen auf. Die Translokation der Substrate über das ABC-Transportsystem AcbHFG kann

ausgeschlossen werden, da zum Zeitpunkt der beschriebenen Messungen die extrazelluläre Komponente AcbH nicht zur Proteinausstattung von *Actinoplanes* sp. gehört (s. 6.7.1). Darüber hinaus ist für AcbH ein anderes Substratspektrum ermittelt worden (s. 6.5). Dafür konnte aus Kulturüberständen nach Anzucht der Zellen in Maltose/Maltodextrin-haltigen Medien ein potentiell Maltose/Maltodextrin-Bindeprotein isoliert werden (s. 6.3).

Für die **Aufnahme von Maltose über einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportmechanismus** sprechen die kinetischen Parameter, die mit K_m -Werten zwischen 3 μM und 33,3 μM im charakteristischen Konzentrationsbereich von ABC-Systemen liegen (s. Tabelle 7.1). Unterstützend ist der Befund, dass in Experimenten zur Phosphorylierung von radioaktiver Maltose mit PEP in zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. keine Aktivität eines Maltose-PTS nachgewiesen werden konnte. Der erfolgreiche Nachweis einer Aktivität des Glukose-PTS (POSTMA *ET AL.*, 1993) durch Phosphorylierung von Methyl- α -D-[U- ^{14}C]-glukopyranosid in Zellextrakten von *E. coli* K12 wurde als Positivkontrolle herangezogen.

Tabelle 7.1: Kinetische Parameter verschiedener ABC-Transportsysteme für Maltose/Maltodextrine. Die angegebenen Parameter zeigen Zellen nach Anzuchten mit Maltose.

Organismus	Kinetische Parameter des Maltosetransports		Referenz
<i>Actinoplanes</i> sp.	$K_m = 9,7 \mu\text{M}$	$V_{\max} = 3,5 \text{ nmol/mg Protein} \times \text{min}$	diese Arbeit
<i>S. lividans</i>	$K_m = 4,5 \mu\text{M}$	$V_{\max} = 0,8 \text{ nmol/mg Trockengewicht} \times \text{min}$	SCHLÖSSER <i>ET AL.</i> , 1997
<i>S. reticuli</i>	$K_m = 1,5 \mu\text{M}$	$V_{\max} = 1,3 \text{ nmol/mg Trockengewicht} \times \text{min}$	SCHLÖSSER <i>ET AL.</i> , 1997
<i>A. acidocaldarius</i>	$K_m = 1 \mu\text{M}$	$V_{\max} = 0,6 - 3,7 \text{ nmol/mg Protein} \times \text{min}$	HÜLSMANN <i>ET AL.</i> , 2000
<i>E. coli</i>	$K_m = 1 \mu\text{M}$	$V_{\max} = 20 \text{ nmol}/10^9 \text{ Zellen} \times \text{min}$ $V_{\max} = 3 \text{ nmol/mg Protein} \times \text{min}^*$	SZMELCMAN <i>ET AL.</i> , 1976

* Berechnet auf der Basis von 10^9 Zellen = 150 μg Protein (MILLER, 1972; XAVIER *ET AL.*, 1996)

Die Anzucht von *Actinoplanes* sp. mit Glukose führt nicht zur Ausbildung einer Transportkapazität für Maltose/Maltotriose. Der Einfluss der anderen verwendeten Kohlenstoffquellen beruht vermutlich auf einem Aktivierungsmechanismus. Möglicherweise wird ein Repressorprotein bei Anwesenheit der jeweiligen Induktoren ungleich effizient inaktiviert. Bei dem gramnegativen Bakterium *Sinorhizobium meliloti* wird die Synthese der redundanten, multiplen ABC-Transporter ThuEFGK und AglEFGK, die beide Maltose, Trehalose und Saccharose importieren, durch die einzelnen Substrate unterschiedlich stark

induziert (JENSEN *ET AL.*, 2002). Im Fall der Zellen aus Anzuchten mit Acarbose oder Glycerin ist eine induzierende Wirkung entweder dieser Substanzen oder aber von Folgeprodukten des Stoffwechsels denkbar. In die bisherigen Kenntnisse zum Habitus von *Actinoplanes* sp. ist die Bedeutung des für den Maltodextrin-Metabolismus als neutral zu beschreibenden Glycerins nicht integrierbar. Aus Fütterungsexperimenten mit [^{14}C]-Glycerin ging hervor, dass diese Substanz in den Valienamin-Rest der Acarbose eingebaut wird (DEGWERT *ET AL.*, 1987). Weiterhin gibt es lediglich den durch diese Arbeit erhaltenen Befund, dass Glycerin ebenso effektiv als Kohlenstoff- und Energiequelle wie Maltose, Maltodextrine, Trehalose und Saccharose genutzt werden kann. Bei *A. acidocaldarius* (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000) und *E. coli* fungiert Glycerin nicht als Induktor einer Maltose-Transportaktivität. Bei der Bewertung der Transportdaten muss auch berücksichtigt werden, dass innerhalb des Zeitraumes der Transportmessungen ein unbekannter, aber wahrscheinlich durchaus beträchtlicher Anteil der intrazellulär angereicherten Maltose bzw. Maltotriose verstoffwechselt wird. Die Radioaktivität geht dann durch Eintritt in die Atmosphäre in Form von [^{14}C]- CO_2 der Quantifizierung verloren. Verfolgt man diese Anmerkung, so lässt sich festhalten, dass die Verluste an Radioaktivität in Zellen aus Maltose/Maltodextrin-gefütterten Kulturen sowie aus TSB-Vollmedium (enthält Maltose) am größten sind. Daran muss eine Enzymausstattung beteiligt sein, die bei Zellen aus Kultivierungen mit Acarbose oder Glycerin möglicherweise nicht vorhanden ist. Ein radioaktives, nicht verstoffwechselbares Maltose-Analogon zur Überprüfung dieses Sachverhaltes steht nicht zur Verfügung.

Sobald genetische Manipulationen von *Actinoplanes* sp. realisierbar sind, könnten hier auch Transportexperimente mit Knock-out-Mutanten, z. B. im Gen der Maltase, aufschlussreich sein. Die Maltase von *Actinoplanes* sp. ist ein durch Acarbose hemmbares Enzym (DREPPER, 1997). Hierin ist möglicherweise auch eine Ursache für die hohen Mengen der intrazellulär nachgewiesenen [U- ^{14}C]-Maltose, zumindest im Fall der mit Acarbose kultivierten Zellen, zu sehen. Es liegen bisher keine Informationen darüber vor, ob unter diesen Wachstumsbedingungen die Acarbose-Kinase aktiv ist und die Hemmwirkung der Acarbose durch Phosphorylierung abschwächt (s. auch Seite 11 und Abbildung 4.2). Ein Hinweis auf fehlende Kinase-Aktivität könnte sein, dass das Wachstum von *Actinoplanes* sp. mit Acarbose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nach ca. 24 Stunden zum Erliegen kommt und, ähnlich den Befunden für *E. coli* (s. Abbildung 6.4 und Abschnitt 7.1.1), aufgrund toxischer Effekte sogar zur Zelllyse führt.

Alternativ kann auch folgendes **Szenario zum Maltose/Maltotriose-Transport** von *Actinoplanes* sp. entworfen werden: Ein System erlaubt Transportaktivität bei Anzucht der Zellen mit Acarbose (und unter Vorbehalt mit Glycerin). Ein zweites System wird transkriptionell unterschiedlich effizient durch Saccharose, Trehalose, Maltose und Maltodextrine aktiviert. Hinweise darauf, dass zur Ausstattung von *Actinoplanes* sp. mindestens **zwei verschiedene ABC-Transportsysteme** gehören, die darüber hinaus ein multiples Substratspektrum aufweisen könnten, geben die ermittelten spezifischen Eigenschaften der Transportaktivität für Maltose/Maltotriose. Der Maltosetransport von Zellen aus Kultivierungen mit Acarbose, MD50, Maltose oder Maltodextrinen wird durch Trehalose, Saccharose und Maltodextrine und z. T. auch Acarbose inhibiert. Eine Auswahl der Befunde wurde ebenfalls für den Maltotriosetransport beobachtet (s. Abbildungen 6.7 und 6.10). Relevant für die Differenzierung von zwei Transportsystemen sind drei Auffälligkeiten der jeweiligen Hemmmuster. Sowohl der Maltose- als auch der Maltotriosetransport von Zellen aus Anzuchten mit Maltose oder Maltodextrinen werden durch Acarbose zu ca. 40 % inhibiert, hingegen findet man keine Einschränkungen beider Transportaktivitäten bei Zellen, die mit diesem Pseudotetrasaccharid kultiviert wurden. Damit lässt sich die in Acarbose-Zellen (und in Glycerin-Zellen) erfasste Transportaktivität von der in Maltose/Maltodextrin-Zellen vorhandenen Aktivität abgrenzen. Eine zweite, unterstützende Besonderheit beruht auf einem unterschiedlichen Ausmaß der Hemmung. Das bei Acarbose-Zellen involvierte System zeigt bei Anwesenheit von Trehalose und Saccharose nur noch halb so viel Restaktivität der Maltoseaufnahme (13 %) wie dasjenige von Zellen aus MD50-Kulturen (ca. 25 %). Wesentlich für eine Diskriminierung der jeweiligen Spezifitäten sind drittens auch die ungleichen Restaktivitäten nach Ausverdünnung des radioaktiven Substrats durch die homologe Zuckerstruktur: Mit Ausnahme der Aktivitäten von Acarbose-Zellen (Hemmung zu 80 %) wird der Maltotriosetransport von restlichen überprüften Kulturen durch Maltose nur zu ca. 50 % inhibiert. Der Maltosetransport wiederum ist bei Acarbose-Zellen durch Maltodextrine weniger gehemmt (Restakkumulation ca. 30 %) als die durch Ausverdünnung durch kalte Maltose erreichte Menge messbarer akkumulierter radioaktiver Maltose. So scheint es nicht abwegig, aus den Ergebnissen der Hemmstudien neben dem Vorhandensein zweier Maltose/Maltodextrin-Transportsysteme außerdem abzuleiten, dass das System in Acarbose-Zellen eher Maltose als Maltodextrine bevorzugt, während der zweite Transporter gegenteilige Präferenz zeigt. Das Maltose/Maltodextrinsystem von *S. lividans* weist solche Präferenzen nicht auf (SCHLÖSSER *ET AL.*, 2001). Die beiden multiplen ABC-Transporter

ThuEFGK und AgleEFGK aus *S. meliloti* favorisieren Trehalose und Saccharose (JENSEN *ET AL.*, 2002). Wie auch bei *Actinoplanes* sp. für den Maltoseimport beobachtet, haben Glukose und Laktose ebenfalls einen negativen Effekt auf den Trehalose- und Saccharose-Import. Die Autoren sprechen aber nicht von einer Hemmung und beziehen diese Zucker nicht in das Substratspektrum mit ein. Der durch die vorliegende Arbeit gefundene Sachverhalt, dass Zellen von *Actinoplanes* sp. aus Trehalose- und Saccharose-Kulturen höhere Maltose-Transportraten aufweisen als Zellen aus Maltose- oder Maltodextrin-Kulturen (s. Abbildung 6.6), gleicht den Befunden zu *S. meliloti*. Damit wird die Annahme untermauert, dass *Actinoplanes* sp. ebenfalls über zwei Transportsysteme mit multiplem Substratspektrum verfügt. Diese postulierten Systeme zeigen eine überlappende Spezifität, unterscheiden sich aber in ihrer Sensitivität gegenüber Acarbose. Ein bekannter ABC-Transporter mit multipler Funktion von grampositiven Bakterien ist das Msm-System (**m**ultiple **s**ugar **m**etabolism, Import von Melibiose, Raffinose und Isomaltotriose) von *Streptococcus mutans* (RUSSELL *ET AL.*, 1992). Auch für *S. coelicolor* und *S. lividans* werden redundante, multiple Transportsysteme für β -Xyloside und α -Glukoside vorausgesagt (BERTRAM *ET AL.*, 2004). Die Autoren sprechen dem *aglIEFG*-Cluster von *S. coelicolor* die Kodierung einer Permease mit breitem Spektrum für Trehalose, Saccharose, Maltose und zusätzlich Trisacchariden zu.

Die Gene eines der postulierten, multiplen Transportsysteme könnten durch die Substrate Saccharose, Trehalose, Maltose und Maltodextrine unterschiedlich effizient induziert werden. **Regulationsmechanismen**, basierend auf der Inaktivierung eines Repressorproteins kataboler Operone, gibt es bei dem Msm-System von *S. mutans* (RUSSELL *ET AL.*, 1992) und den Maltose/Maltodextrin-Transportern von *S. pneumoniae* (PUYET *ET AL.*, 1993; NIETO *ET AL.*, 2001), *S. coelicolor* (VAN WEZEL *ET AL.*, 1997a) oder auch *S. lividans* (SCHLÖSSER *ET AL.*, 2001).

Betrachtet man die Maltose- und Maltotriose-Transportaktivität in Abhängigkeit von der zur Kultivierung der Zellen angebotenen Substratkonzentration (s. Abbildungen 6.6 und 6.9), erscheint ein alternativer Regulationsmechanismus vorstellbar. Im Vergleich zu Wachstum mit 0,5 % MD50 erreichten Zellen nach Anzucht mit 7 % MD50 lediglich Transportraten von 50 % ($[^{14}\text{C}]$ -Maltose) bzw. 30 % ($[^{14}\text{C}]$ -Maltotriose). Eine Regulation, basierend auf Repression durch Substrat, findet man bei *Thermotoga maritima*. Die Maltose-Bindeaktivität von Periplasmaextrakten ist bei Anzucht der Zellen in Maltose schwächer als die Glukose-Bindeaktivität, während umgekehrt bei Anzucht in Glukose die Maltose-Bindeaktivität höher ist als die Glukose-Bindeaktivität (NANAVATI *ET AL.*, 2002). Bei *T. maritima* existieren

interessanterweise zwei ORFs, annotiert als Maltose-Bindeproteine (NELSON *ET AL.*, 1999; 2001), für die durch WASSENBERG *ET AL.* (2000) und NANAVATI *ET AL.* (2002) eine Maltose-Bindeaktivität nachgewiesen wurde. Bei *E. coli* wird das Bindeprotein-abhängige Glukosetransportsystem Mgl bei mikromolaren Glukosekonzentrationen aktiviert, bei millimolaren Konzentrationen aber wieder reprimiert (DEATH & FERENCI, 1993). Bei *A. acidocaldarius* (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000) befindet sich im Operon für die Aufnahme und Verwertung von Maltodextrinen das Gen *malR*, welches für ein Repressorprotein der LacI-GalR-Familie kodiert. Die Repressorfunktion von MalR wird durch die Induktoren des Systems Maltose und Maltotriose inaktiviert (ZIELINSKI, 2003). Da das *malR*-Gen über keine eigene Promotorstruktur verfügt, wird dessen Expression möglicherweise wie die der übrigen Gene induziert. Vielleicht gibt es bei *Actinoplanes* sp. innerhalb eines noch zu identifizierenden *mal*-Operons (s. auch 6.3 und 7.2.2) ein Repressorgen, dessen Expression ebenfalls durch Maltose und/oder Maltodextrine induziert wird und bei hohem Substratangebot schließlich für eine Abschaltung des Systems sorgt. Diese Art der Regulation hoch affiner Transportsysteme ist ökonomisch sinnvoll. Die von *Actinoplanes* sp. im Falle der Anzucht mit 7 % MD50 erreichten Transportraten von ca. 1 nmol/mg Protein x min sind für das beobachtete Wachstum offenbar ausreichend, die Energie für eine aufwendige Produktion überschüssiger Translokationssysteme bleibt konserviert. Hiervon abgeleitet könnten die hohen Transportraten der Acarbose- und Glycerin-Zellen auch auf geringen Mengen intrazellulär formierter Maltose beruhen, die insgesamt nicht ausreichen, das Gen eines potentiellen Repressors zu induzieren.

Die Analyse des TSB-Vollmediums durch Dünnschicht-Chromatographie zur Überprüfung eines etwaigen Vorkommens von Zuckern in dieser Substanz enthüllte Glukose und Maltose als Bestandteile. Das Auftreten einer Maltose-Transportaktivität bei *Actinoplanes* sp. nach Anzucht in TSB lässt vermuten, dass Mechanismen einer Glukoserepression nicht nach dem Prinzip des Induktorausschlusses wie bei Enterobakterien wie z. B. *E. coli* (BOOS & SHUMAN, 1998) oder einer CcpA vermittelten Repression kataboler Operone wie bei grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wie z. B. *B. subtilis* (SCHÖNERT *ET AL.*, 1998; REIZER *ET AL.*, 1998) funktionieren (Übersicht STÜLKE & HILLEN, 1999; TITGEMEYER & HILLEN, 2002; s. auch 4.2.4). Vielmehr gleicht der Befund, dass Maltosetransport in *Actinoplanes* sp. auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Maltose und Glukose während des Wachstums stattfindet, den Ergebnissen von Transportstudien, die mit *A. acidocaldarius* (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000) oder *S. lividans* (SCHLÖSSER *ET AL.*, 2001) erzielt wurden. Obwohl die Synthese von CebE,

des Cellobiose-Bindeproteins aus *S. reticuli*, insgesamt anders reguliert wird als die der dem Transport-System assistierenden ABC-Komponente MsiK, können beide Proteine bei Ko-Kultivierung der Zellen in Cellobiose und Glukose nachgewiesen werden (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1999). Bei der Glukose-Katabolitrepression in gramnegativen wie in grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt spielen Proteine des Phosphotransferase-Systems (PTS) nach einem jeweils eigenen Mechanismus eine zentrale Rolle. Als weiteres regulatorisches Element findet man bei grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt *cre*-Boxen vor oder auch innerhalb der Gene kataboler Enzyme (TITGEMEYER & HILLEN, 2002). Solche Elemente wurden für das analysierte Gencluster der Acarbose-Biosynthese nicht beschrieben (STRATMANN, 1997). In der Tat ist auch die Synthese der extrazellulären Enzyme AcbD und AcbE von *Actinoplanes* sp. nach Anzucht in Vollmedium TSB oder auch in Acarbose-Produktions-Medium mit Glukosezusatz nachweisbar. Gleiches gilt für die in dieser Arbeit dokumentierte Synthese des Proteins AcbH durch Zellen während der Kultivierung in TSB-Vollmedium (s. 6.7.1). Bei Actinomyceten ist bisher kein Glukose-spezifisches PTS gefunden worden, dem HPr-Protein des Fruktose-PTS von *S. lividans* wird keine Funktion innerhalb einer Katabolitrepression zugesprochen (NOTHAFT *ET AL.*, 2003). Während die Synthese der α -Amylase in *S. venezuelae* durch Glukose reprimiert wird (VIROLLE *ET AL.*, 1988), agiert bei *S. limosus* und *S. thermoviolaceus* Mannitol als Effektor (VIROLLE & BIBB, 1988; BAHRI & WARD, 1990). Durch weitere Transportexperimente mit Zellen aus Kultivierungen mit z. B. Mannitol, Mannose oder Fruktose etc. könnte eine reprimierende Kohlenstoffquelle identifiziert werden.

7.2.2 Charakterisierung eines potentiellen Maltose-Bindeproteins

Der für *Actinoplanes* sp. nachgewiesene und charakterisierte Maltose- und Maltotrioseimport impliziert die Beteiligung zweier Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter. Anhand der Befunde zur Substratspezifität und zum Syntheseprofil des Bindeproteins AcbH (s. 6.5 und 6.7.1) kann eine Beteiligung des im Acarbose-Biosynthese-Gencluster vertretenen ABC-Systems AcbHFG ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von Gensonden der Maltose-Bindeproteine aus *S. lividans* und *A. acidocaldarius* wurde in DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten versucht, ein homologes Gen im Chromosom von *Actinoplanes* sp. zu finden. Vor allem aufgrund eines ähnlich hohen GC-Gehaltes der DNA von *S. lividans* und *Actinoplanes* sp. (69 % - 70 %) sowie einer aus den Leserahmen des *acb*-Genclusters

ermittelten, für Streptomyceten typischen Kodon-Verwendung durch *Actinoplanes* sp. (STRATMANN, 1997), schien dieses Verfahren vielversprechend. Dennoch konnte unter verschiedenen Bedingungen mit keiner der verwendeten Sonden ein Hybridisierungssignal detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde mit einer Sonde des *msiK*-Gens aus *S. lividans* das Gen für ein ABC-Protein in *Actinoplanes* sp. und *A. acidocaldarius* identifiziert (s. Abschnitt 6.6.1, SCHÄFER, 1999; SCHEFFEL *ET AL.*, 2004). Dabei waren vermutlich die hohen Sequenzähnlichkeiten zwischen ABC-Proteinen der CUT1-Familie (SAIER, 2000; SCHNEIDER, 2001) von Vorteil. Der Verwandtschaftsgrad von *Actinoplanes* und *Streptomyces* ist offensichtlich für die Identifizierung eines Substrat-Bindeproteins nicht ausreichend, zumal Bindeproteine neben der varianten Signatursequenz (vgl. Seite 20, Abbildung 4.5) keine weiteren charakteristischen Konsensussequenzen aufweisen. Das von STRATMANN (1997) gefundene Gen der dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase (*acbB*) wurde unter Einsatz einer Sonde des verwandten Gens *strE* aus dem Streptomycin-Biosynthese-Gencluster von *S. griseus* detektiert. Hier reichte eine Identität von 66,3 % aus, während mit dem Gen der dTDP-Glukose-Synthase *strD* das später anderweitig gefundene homologe Gen *acbA* in Hybridisierungsexperimenten nicht erfasst wurde (Identität 59 %).

Wie bei grampositiven Bakterien üblich, sind Substrat-Bindeproteine über einen N-terminalen Lipidanker in der Membran fixiert (s. 4.2.3.2). In einem alternativen Ansatz wurde daher versucht, ein Maltose-Bindeprotein nach Solubilisierung von Membranen aus Zellen nach der Anzucht mit Maltose und Maltodextrinen über Amylose-Affinitätschromatographie zu isolieren. Jedoch auch dieses Verfahren verlief ohne Erfolg.

Für *Actinoplanes* sp. hat sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Befund ergeben, dass ein potentiell Maltose-Bindeprotein im Überstand von Zellkulturen vorhanden ist. Auch MsmE, das Bindeprotein für multiple Zucker aus *S. mutans*, ist frei im Kulturüberstand nachzuweisen (SUTCLIFFE *ET AL.*, 1993). Auf einen ähnlichen Sachverhalt stößt man bei *A. acidocaldarius* (HÜLSMANN, 2000). Der größte Teil des MalE-Proteins konnte hier aus dem Kulturüberstand gewonnen werden. Dabei ist dieses Bindeprotein inklusive des Lipidankers N-terminal um 23 Aminosäuren verkürzt, vermutlich durch die Aktivität einer extrazellulären Protease. Eine Einschränkung der biochemischen Eigenschaften *in vitro* ist nicht beobachtet worden. Das identifizierte Protein von *Actinoplanes* sp. könnte ebenfalls nach Proteolyse aus der Membranfixierung entlassen werden, wobei die Aktivität offensichtlich erhalten bleibt. Ein experimenteller Beleg dafür ist das Bindungsvermögen an eine Amylose-Matrix und die

spezifische Elution des Proteins durch Maltose und Maltodextrine (s. 6.3.1). Demgegenüber konnte mit Acarbose keine Ablösung des Proteins erreicht werden.

Zusammenfassend unterstützen diese Resultate die aus den Maltose-Transportmessungen abgeleiteten Annahmen, dass es sich bei den Maltosetransportern um Bindeprotein-abhängige ABC-Systeme handelt, von denen das eine insensitiv gegenüber Acarbose ist. Das aus dem Kulturüberstand isolierte potentielle Maltose-Bindeprotein könnte die dazugehörige extrazelluläre Komponente sein. Abschließend ist jedoch kein Beweis erbracht, dass es sich bei dem diskutierten Protein tatsächlich um das Maltose/Maltodextrin-Bindeprotein eines ABC-Transporters handelt. Es könnte gleichermaßen eine α -Amylase mit Affinität zur Amylose-Matrix sein. In der Regel aber haben solche Enzyme eine größere molare Masse, z. B. AcbE (107 kDa) von *Actinoplanes* sp. (STRATMANN, 1997). Mit 51,3 kDa ist das isolierte Protein allerdings auch größer als die Mehrzahl der bekannten Bindeproteine (40 – 43 kDa). Mit den nach einer MALDI-TOF MS-Analyse erhaltenen Sequenzinformation der analysierten Peptide (s. Anhang) konnte in Datenbanken keine Übereinstimmung zu bekannten Proteinen gefunden werden. Ein Abgleich mit den Sequenzdaten der Genprodukte des *acb*-Genclusters erbrachte ebenfalls keinerlei Übereinstimmung (pers. Mitteilung U. Wehmeier).

Weitere Erkenntnisse zu diesem Sachverhalt können nur auf Basis von Arbeiten mit geeigneten Mutanten oder rekonstituierten Transportsystemen gewonnen werden. Eine bisher nicht realisierbare Strategie wäre die Deletion des Gens für das aus dem Kulturüberstand isolierte Maltose-Bindeprotein. Voraussetzung für eine Rekonstitution ist die Klonierung der beteiligten Gene. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit einer degenerierten DIG-markierten DNA-Sonde, abgeleitet aus der Sequenz eines der Peptide, zumindest ein Hybridisierungssignal detektiert werden (s. 6.3.2). Leider ist es bislang nicht gelungen, das entsprechende chromosomale Fragment zu klonieren. Es ist anzunehmen, dass toxische Genprodukte des rekombinierten Fragments wie z. B. die Membranproteine des erfassten Transportsystems oder ein Regulatorprotein den Wirtstamm der Vektorkonstrukte (*E. coli*) schädigen. Eine Lösung dieses Problems könnte die allerdings verhältnismäßig aufwendige Nutzung von *S. lividans* als Empfängerstamm der Vektorkonstrukte sein. Ähnliche Schwierigkeiten treten bei der Klonierung des Gens für ein potentielles Regulatorprotein des *acb*-Genclusters auf (pers. Mitteilung U. Wehmeier). Regulatorische Gene sind oft in der Nähe von Operons lokalisiert, die für die Komponenten von Transportkomplexen kodieren, so

z. B. bei den Maltose-Transportsystemen von *S. coelicolor*, *S. lividans* und *Streptococcus pneumoniae* (VAN WEZEL *ET AL.*, 1997a; SCHLÖSSER *ET AL.*, 2001; NIETO *ET AL.*, 2001). Im Fall von *A. acidocaldarius* ist das Gen für einen möglichen Transkriptionsregulator innerhalb der Operonstruktur lokalisiert (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000).

7.2.3 Modell der Kapazitäten für die Aufnahme von Maltose und Maltotriose durch *Actinoplanes* sp.

Die Aufnahme von Maltose und Maltotriose wird wahrscheinlich über zwei Bindeprotein-abhängige ABC-Importsysteme realisiert, die in Abhängigkeit von der zum Wachstum angebotenen Kohlenstoffquelle exprimiert sind (Abbildung 7.2). Das System von mit Acarbose (und vermutlich Glycerin) kultivierten Zellen ist Acarbose-insensitiv. Das aus dem Kulturüberstand isolierte potentielle Maltose/Maltodextrin-Bindeprotein könnte die dazu gehörige extrazelluläre Komponente sein. Die Transportaktivität des zweiten Systems ist durch die Kohlenstoffquellen Saccharose, Trehalose, Maltose und Maltodextrine induzierbar und Acarbose-sensitiv. Beide Systeme verfügen möglicherweise über ein multiples Substratspektrum für Saccharose, Trehalose und Maltooligosaccharide.

Wie bei *E. coli* (BRUNKHORST, 1998; s. auch 6.1) und *A. acidocaldarius* (HÜLSMANN *ET AL.*, 2000) findet man bei *Actinoplanes* sp. nach Anzucht mit Maltose oder MD50 eine Hemmung des Maltose- und Maltotriose-Transports durch Acarbose. Für solche Zellen konnte nur eine geringe Menge intrazellulär akkumulierter, radioaktiver Acarbose nachgewiesen werden (0,1 nmol/mg Protein x min). Ob die Acarbose tatsächlich, wie im Falle von *E. coli*, über dasselbe Transportsystem aufgenommen wird, bleibt unklar. Ebenso ist noch nicht bewiesen, dass Trehalose und Saccharose zusammen mit Maltose und Maltotriose über dasselbe System importiert werden. Trehalose z. B. induziert auch das Mal-System von *E. coli*, ohne durch dieses transportiert zu werden (KLEIN & BOOS, 1993). Das Substrat-Bindeprotein stellt die primäre Erkennungsstelle bakterieller Importsysteme dar und bestimmt dadurch die Spezifität. Substanzen, die mit dem natürlichen Substrat um die Bindestelle konkurrieren, werden nicht zwangsläufig auch transportiert. So wurde z. B. die Bindung von β -Cyclodextrinen und länger-kettigen Maltodextrinen (> Heptaosen) an das Maltose-Bindeprotein von *E. coli* gezeigt, ein Transport dieser Substanzen findet jedoch nicht statt (HALL *ET AL.*, 1997a; 1997b; 1997c; BOOS & SHUMAN, 1998).

Ausgeschlossen jedoch ist, dass das in Acarbose-Zellen aktive Maltosetransportsystem als Vehikel für den Import von Acarbose, der deutlich nur bei solchen Zellen nachgewiesen werden konnte (1,2 nmol/mg Protein x min), fungiert. Die Insensitivität des Systems gegenüber Acarbose deutet an, dass das Pseudotetrasaccharid über einen weiteren, bisher unbekannten Transporter aufgenommen wird. Möglicherweise dient dieser Komplex einem unspezifischen Eintritt ins Zellinnere, welcher *Actinoplanes* sp. langsames Wachstum mit dem Sekundärmetaboliten (s. Seite 50, Abbildung 6.4) vor Beginn der Synthese des AcbHFG-Transporters erlaubt.

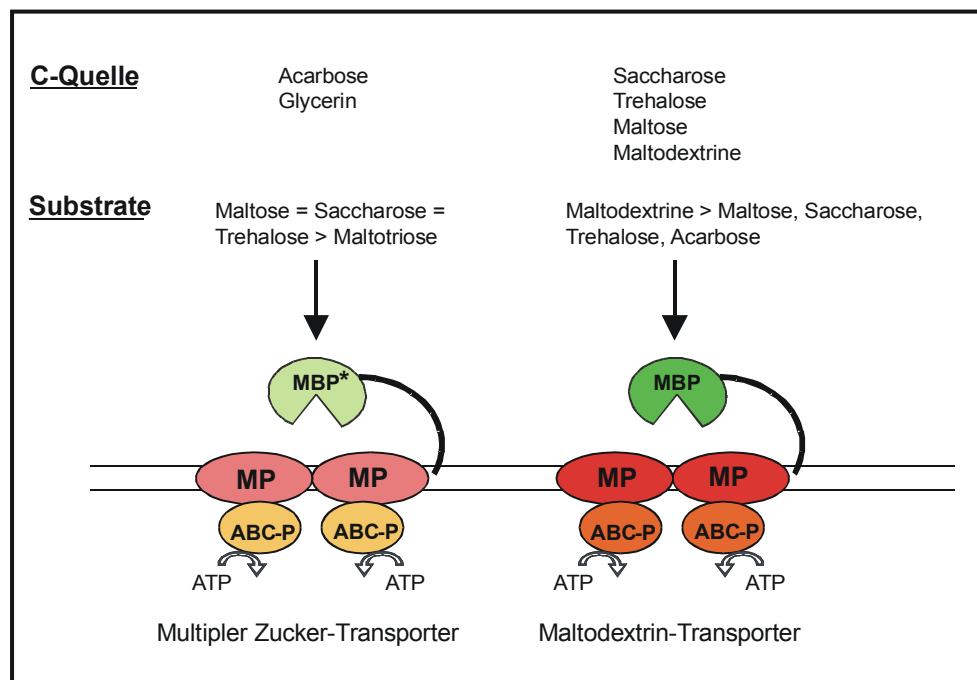


Abbildung 7.2: Mögliche Ausstattung von *Actinoplanes* sp. mit ABC-Transportern für Maltose und Maltodextrine. Das Transportsystem in mit Acarbose kultivierten Zellen präferiert Maltose gegenüber Maltodextrinen. Das andere System zeigt gegenteilige Präferenz. **MBP:** Maltose-Bindeprotein, das mit * gekennzeichnete MBP könnte das aus dem Kulturüberstand isolierte sein. **MP:** Membranprotein, **ABC-P:** ABC-Protein.

7.3 Charakterisierung des potentiellen Acarbose-ABC-Transporters AcbHFG-MsiK₂

Zur Aufklärung der Substratspezifität der Genprodukte eines Operons (*acbHFG*) aus dem *acb*-Gencluster, das vermutlich die Komponenten eines Bindeprotein-abhängigen ABC-Importers kodiert, wurden die Gene heterolog in *E. coli* und *S. lividans* exprimiert und die synthetisierten Proteine z. T. gereinigt (s. 6.4.3 und 6.6.2). So sollten Grundlagen für eine Rekonstitution des isolierten Transportkomplexes in Liposomen geschaffen werden. Da im *acb*-Gencluster kein Gen für ein den Transportkomplex komplettierendes ABC-Protein vorhanden ist, wurde das Produkt des *msiK*-Gens als potentiell zugehörige ATPase angeboten (SCHÄFER, 1999; ELVERS, 2002). Für ABC-Proteine grampositiver Bakterien ist bekannt, dass sie mehreren Transportkomplexen assistieren können (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1997; SCHLÖSSER, 1999; SCHEFFEL *ET AL.*, 2004) und das zugehörige Gen einer getrennten Lokalisation auf dem Chromosom und Regulation unterliegt (HORLACHER *ET AL.*, 1998; GRELLER *ET AL.*, 1999; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000). Außerdem war es ein besonderes Ziel, das Substratspektrum von AcbH aufzuklären (s. 6.5) sowie immunologisch das Induktionsprofil von AcbH in *Actinoplanes* sp. zu bestimmen (s. 6.7.1).

7.3.1 Der potentielle Transportkomplex AcbFG-MsiK₂

Die Überexpression der Gene der Membranproteine AcbFG führte zunächst zu einer Wachstumsbeeinträchtigung des Expressionsstammes *E. coli* JM109. Durch Ko-Synthese mit dem von SCHÄFER (1999) identifizierten ABC-Protein MsiK jedoch konnten die nachteiligen Wachstumseffekte z. T. kompensiert werden. Dadurch war es möglich, im Rahmen der Reinigung der Membranproteine höhere Ausbeuten zu erzielen (ELVERS, 2002). Darüber hinaus wurde in Ko-Elutionsstudien ein weiterer Hinweis auf eine Komplexbildung der Membranproteine AcbFG mit dem ATP-Bindeprotein MsiK, zumindest in *E. coli*, erhalten (s. 6.6.2).

Mit einem gegen MsiK gewonnenen Antiserum konnten für ein erstmalig identifiziertes ABC-Protein aus *Actinoplanes* sp. immunologische Analysen mit Zellfraktionen unternommen werden. Es sollte gelingen, einen Hinweis auf die Ausbildung eines AcbFG-MsiK₂-Komplexes im Acarboseproduzenten zu finden und einen Kontext mit dem Acarbose-Metabolismus herzustellen (s. auch 6.7.2). Die für das ABC-Protein MsiK ermittelten konstitutiven Synthesebedingungen durch ELVERS (2002) geben jedoch keinen weiteren

Hinweis auf eine den Membrankomplex AcbFG komplettierende Funktion *in vivo*. Im Gegensatz zum Induktionsprofil des *acbH*-Gens (vgl. 6.7.1) konnte unter den getesteten Wachstumsbedingungen weder eine repressive noch eine induzierende Substanz für das *msiK*-Gen gefunden werden. Das MsiK-Protein aus *S. reticuli* assistiert im Maltose- Cellobiose- und wahrscheinlich Trehalose-Transport. Bei einer basalen Genexpression während des Wachstums in Minimalmedium mit Glukose führt die Zugabe der zuvor erwähnten Disaccharide zur Induktion der Proteinsynthese. Das homologe Protein von *S. lividans*, mit dessen Gen das ABC-Protein in *Actinoplanes* sp. identifiziert wurde, ist nicht am Trehalose-Import beteiligt, erfährt dementsprechend nur Induktion durch Maltose und Cellobiose (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1999; SCHLÖSSER, 1999). Da Zellen von *Actinoplanes* sp. das MsiK-Protein über einen Zeitraum von 72 Stunden, zumindest bei Kultivierung mit 0,5 % Acarbose oder MD50, synthetisieren (eigene Beobachtung), ist eine Zusammengehörigkeit von MsiK zu AcbHFG aber auch nicht auszuschließen. Ob das betrachtete Protein tatsächlich physiologisch relevant ist, kann nur durch eine Deletionsmutante geklärt werden.

Für zukünftige Arbeiten sollte ein Expressionssystem entwickelt werden, das eine der Stöchiometrie des Komplexes AcbFG-MsiK₂ entsprechende Syntheserate der Einzelkomponenten ermöglicht. Sowohl für solch ein System als auch für die Expression von *acbH* könnten bei Verwendung der zugehörigen Promotorstrukturen auch Expressionsstudien in *S. lividans* sinnvoll sein. Dabei jedoch muss darauf spekuliert werden, dass die Promotoren von *Actinoplanes* sp. durch die Regulations- und Transkriptionsmaschinerie in *S. lividans* erkannt werden. Im Fall der α -Amylase AcbE, nicht jedoch bei AcbD und AcbC, erwies sich diese Strategie als erfolgreich (STRATMANN, 1997). Als induzierende Effektoren könnten Maltose, Maltodextrine oder Acarbose eingesetzt werden (s. 6.7.1). WEHMEIER *ET AL.* (pers. Mitteilung) ist es mittlerweile gelungen, durch Expression eines das gesamte *acb*-Gencluster enthaltenen Cosmids die heterologe Acarbose-Produktion in *S. lividans* zu erzielen.

7.3.2 Das Substrat-Bindeprotein AcbH

Von insgesamt neun Plasmidkonstrukten zur Expression von *acbH* in *E. coli* mit dem Ziel einer Lokalisation des Genproduktes im Cytosol, führten sechs zu einer beträchtlichen Synthese von Proteinen mit verschiedenen Histidin-Tag-Fusionen, die jedoch alle als unlösliche Aggregate vorlagen. Ein ähnliches Resultat wurde für die Proteine AcbD, AcbE und AcbC erhalten (STRATMANN, 1997). Im Hinblick auf die Sequenzproblematik (s. 6.4.1)

und die Substratbindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (s. 6.5) war letztendlich nur das (His)₁₀-AcbH-Fusionsprotein (Plasmid pCB10) zur weiteren Verwendung geeignet. Eine heterologe Überproduktion von Lipoproteinen führt in vielen Fällen zu Problemen für das Zellwachstum des Wirtsstammes (MARTIN *ET AL.*, 1989; SUTCLIFFE *ET AL.*, 1993; SCHNEIDER & HANTKE, 1993). Sämtlichen Klonen fehlt daher der für das Signalpeptid kodierende Sequenzabschnitt. Darüber hinaus wurde ein lethaler Effekt für die Expressionsstämme durch eine mögliche Lipidmodifikation am Cystein-1 des reifen Proteins durch Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin oder Methionin vermieden.

Ein alternativer Ansatz, in dem es gelingen sollte, durch ein dem Protein vorgeschaltetes PelB-Signalpeptid aus *E. coli* eine Translokation des Proteins mit C-terminaler HistidinFusion in das Periplasma zu erreichen, schlug gänzlich fehl. In den dazu verwendeten Stämmen C41 und C43 konnte keine Proteinsynthese nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise darauf, dass für eine erfolgreiche Translokation und Prozessierung neben dem Signalpeptid auch die Sequenz des reifen Proteins von Bedeutung ist (SIMONEN & PALVA, 1993; FEKKES & DRIESSEN, 1999). Möglicherweise wurde das mit dem PelB-Signalpeptid synthetisierte AcbH-Fusionsprotein vom Sec-System des Wirtsstammes (ECONOMOU, 1999) nicht erkannt und unterlag einer vollständigen proteolytischen Degradation. Durch Substitution der Signalsequenzen der Maltose- und Trehalose- bzw. Maltose-Bindeproteine von *T. litoralis* bzw. *A. acidocaldarius* durch die entsprechende Sequenz des MalE von *E. coli* wurde ebenfalls keine korrekte Prozessierung erreicht (HORLACHER *ET AL.*, 1998; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000).

Im Gegensatz zur Verwendung von *E. coli* als Wirtstamm konnte mit *S. lividans* TK23 lösliches Protein erhalten werden (s. 6.4.2). Hierbei erwies sich jedoch die Ausbeute als zu gering für weitere Untersuchungen. Deshalb wurde das Protein schließlich in denaturierter Form gereinigt und anschließend renaturiert. Die Vorteile unlöslicher Proteinaggregate liegen darin, dass die Proteine bereits angereichert vorliegen und oft nach geeigneten Zentrifugationen kaum noch mit anderen Proteinen verunreinigt sind. Überdies sind die Proteine, fixiert in den unlöslichen Aggregaten, meist geschützt vor proteolytischem Abbau (DE BERNARDEZ CLARK, 2001).

So wurde ein Protokoll zur Reinigung von AcbH unter denaturierenden Bedingungen und zur anschließenden Renaturierung entwickelt (s. 6.4.3) und der Erfolg mittels CD-Spektroskopie überprüft. Mit Elliptizitätsminima bei 222 nm und 207 nm ist deutlich eine α -helikale

Konformation und damit die Voraussetzung für eine Aktivität des (His)₁₀-AcbH-Fusionsproteins nachgewiesen (s. Seite 75, Abbildung 6.17). Diese Aktivität spiegelt sich in den Sensorgrammen in Abschnitt 6.5 wider. Insgesamt konnten trotz der Unterschiede im GC-Gehalt der DNA sowie bei der Kodon-Verwendung und der geringen Verwandtschaftsnähe in *E. coli* die besseren Ausbeuten an gereinigtem AcbH-Protein erzielt werden.

Hinweise auf mögliche Substrate von AcbHFG ergaben sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit lediglich aus der Hypothese eines intra- und extrazellulären Acarbose-Kreislaufs (s. Abschnitt 4.1). Die Befunde einiger in dieser Arbeit beschriebener Experimente wie die verbesserte Renaturierung von AcbH in Gegenwart von Acarbose (s. Seite 76, Abbildung 6.18) oder die Feststellung, dass das Protein nicht über eine Bindekapazität für Amylose verfügt (s. Seite 72, Abbildung 6.14), gaben weitere Anhaltspunkte. Mittels Oberflächen-Plasmonresonanz konnten für Acarbose und die längerkettigen Nebenkompenten, nicht jedoch für Maltose, Maltodextrine und Saccharose Assoziation an (His)₁₀-AcbH beobachtet werden (s. Abschnitt 6.5). Insgesamt wurde für Acarbose die stärkste Assoziation (höchste RU-Differenz), gefolgt von den längerkettigen Nebenkompenten 5C und 6AB, festgestellt. Hingegen gab es nur eine sehr schwache Interaktion mit dem Komponentengemisch 4ABC. Die Ursachen hierfür bleiben unbekannt. Obwohl die gesättigte Belegung mit Acarbose von 74 % und ein deutlicher Anteil α -helikaler Strukturen für eine erfolgreiche Renaturierung des AcbH-Proteins sprechen, geben die ermittelten Affinitätskonstanten (K_D) von 1,2 mM bis 3,8 mM nicht die für Substrat-Bindeproteine von ABC-Importern typischen Werte (0,01 μ M bis 10 μ M; s. Abschnitt 4.2.2) an. Man könnte spekulieren, dass die für die Substratbindung essentiellen Aminosäuren nach der Renaturierung ungewöhnlich exponiert vorliegen und deshalb eine physiologisch gute Bindungsrate über die RU-Differenz nur suggeriert wird. Die hohen K_D -Werte würden sich dann aus einer strukturell nicht nativen Umgebung der Bindetasche ergeben, die keine Funktionalität erlaubt. Möglicherweise liegt hierin die Ursache für die mangelnde Assoziation der Nebenkompenten 4ABC: Die einzelnen Substanzen könnten aufgrund ihrer gegenüber den Derivaten 5C und 6AB kürzeren Monomerenkette nur eine ungenügende Zahl an Wasserstoff-Brückenbindungen zum AcbH-Protein ausbilden (s. Seite 77, Tabelle 6.2). Dem gegenüber ist Acarbose relativ klein genug, sich sterisch an Kavitäten der exponierten Bindetasche anzupassen. Für das Cyclodextrin-Bindeprotein CycB aus *B. subtilis* wurden Affinitätskonstanten ermittelt, die mit Werten von

0,1 mM bis 0,5 mM ebenfalls außerhalb der charakteristischen Parameter für ABCTransporter liegen (KAMIONKA & DAHL, 2001).

Dem Modell des Acarbose-Metabolismus folgend, bilden die aus der Aktivität der Acarviosyl-Transferase (ATase) AcbD resultierenden Acarbosederivate die Substrate des ABC-Transportsystems AcbHFG. Berücksichtigt man die Affinität der ATase zu den Substraten Acarbose (Acarviosyl-Donor, $K_m = 0,6$ mM) und Maltose (Acarviosyl-Akzeptor, $K_m = 1$ mM) (HEMKER *ET AL.*, 2001), liegen die für die Bindung von Acarbose und den Derivaten an das AcbH-Protein ermittelten Werte im selben Konzentrationsbereich. Hiervon abgeleitet, könnten die Affinitätskonstanten des renaturierten Zucker-Bindeproteins tatsächlich die physiologischen Eigenschaften des Proteins beschreiben.

Wie für die extrazellulären Enzyme AcbE und AcbD (STRATMANN, 1997) ist auch für das Substrat-Bindeprotein AcbH eine Induktion durch Maltose bzw. verstärkt Maltotriose und darüber hinaus insbesondere durch Acarbose nachgewiesen worden. Die Kohlenstoffquellen Glycerin und Glukose führten nicht zu einer Expression des *acbH*-Gens. (Abbildung 6.25). Wie bei den Lipid-modifizierten Zucker-Bindeproteinen grampositiver Bakterien üblich (s. 4.2.3.2; SUTCLIFFE & RUSSELL, 1995), wurde entsprechend des vorhergesagten Lipoprotein-Charakters für AcbH eine ausschließliche Lokalisation in den Zytoplasmamembranen festgestellt. Weiterhin kann aufgrund des Vorkommens von AcbH in Zellen nach Kultivierung in Vollmedium TSB (enthält Maltose und Glukose) Glukose als Katabolit-Repressor ausgeschlossen werden. Dieser Befund ist konsistent mit den bisherigen Beobachtungen zur Regulation der extrazellulären Enzyme AcbE und AcbD (STRATMANN, 1997) und der Maltose/Maltotriose-Transportaktivität in *Actinoplanes* sp. (s. auch Seite 98). Ebenso findet man das Cellulose-Bindeprotein CebE oder das Maltose-Bindeprotein Male von *S. reticuli* bzw. *A. acidocaldarius* nach Ko-Kultivierung der Zellen in Minimalmedium mit Cellobiose bzw. Maltose und Glukose, nicht jedoch mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle (SCHLÖSSER *ET AL.*, 1999; HÜLSMANN *ET AL.*, 2000). Außerdem unterstützt das Induktionsprofil des AcbH-Proteins die postulierte Beteiligung des AcbHFG-Transportkomplexes am Acarbose-Kreislauf im Rahmen des extra- und intrazellulären Maltodextrin-Metabolismus (s. Seite 11, Abbildung 4.2).

Setzt man voraus, dass die beiden auf der Höhe von ca. 107 kDa und 76 kDa befindlichen Proteine im SDS-Gel in Abbildung 6.23 die α -Amylase AcbE und die ATase AcbD darstellen, während AcbH zu diesem Zeitpunkt immunologisch noch nicht nachweisbar ist,

lässt sich eine physiologisch sinnvolle unabhängige Regulation der drei zugehörigen Gene ableiten: Die Biosynthese von Acarbose durch *Actinoplanes* sp. beginnt bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Offensichtlich sind AcbE und AcbD am extrazellulären Maltodextrin-Metabolismus bereits beteiligt, Acarbose und resultierende Derivate mit breiterem Hemmspektrum fungieren als effektive Inhibitoren der Substratverwertung von Nahrungskonkurrenten im Habitat (s. auch 7.1.2). Hingegen ergibt sich die Notwendigkeit eines Importsystems (AcbHFG) und einer Carbophor-Funktion von Acarbose erst mit Beginn des stationären Wachstums.

7.3.3 Erweitertes Modell des Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde können das zu Beginn existierende Modell zum intra- und extrazellulären Acarbose-Metabolismus (STRATMANN, 1997; WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004) unterstützen bzw. erweitern (Abbildung 7.3; vgl. Seite 11, Abbildung 4.2).

Der Acarbose-Kreislauf beginnt mit der intrazellulären Biosynthese des phosphorylierten Acarviosins. Das tatsächliche Endprodukt ist bisher nicht bekannt. So ist unklar, ob das Pseudodisaccharid oder das mono- oder diglukosylierte Acarviosin (Acarbose-7-Phosphat) über das ABC-Exportsystem AcbWXY unter Dephosphorylierung ins umgebende Medium abgegeben wird **(1)**. Außerhalb der Zelle katalysiert die Acarbose-insensitive α -Amylase AcbE die Freisetzung von Maltose und Maltooligosacchariden aus Stärke. Möglicherweise ist an diesem Prozess auch die α -Amylase AcbZ beteiligt **(2)**. Durch die Aktivität der Acarviosyl-Transferase AcbD werden entweder Acarviosin oder die Acarviosyl-Reste der glukosylierten Derivate auf die Produkte der Stärkehydrolyse transferiert **(3)**. Da für diese Reaktion Maltose den effektivsten Acarviosyl-Akzeptor darstellt und außerdem Acarviosin ein instabiles Molekül ist, spekulieren HEMKER *ET AL.* (2001), dass AcbD am terminalen Schritt der Acarbose-Synthese aus Acarviosin beteiligt ist. Acarbose und die verlängerten Homologe sind Inhibitoren von Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen. Diese Eigenschaft führte zur Vorstellung einer Funktion der Pseudooligosaccharide im Wettbewerb um Nahrungsquellen: die Hemmung artfremder α -Amylasen **(4)**. Diese Art des Konkurrenzverhaltens allein schien jedoch unzureichend, denn auch die Nahrungskonkurrenten im Habitat würden von den Produkten der Stärkehydrolyse profitieren **(2 + 5)**. Im Rahmen dieser

Arbeit konnte eine ökonomisch sinnvollere Strategie aufgezeigt werden. Über eine Inhibition extrazellulärer Hydrolasen α -1,4-glykosidischer Bindungen von Bakterien und Pilzen hinaus übernimmt Acarbose wahrscheinlich eine weitere Rolle bei der Sicherung von Kohlenstoff- und Energiequellen im Habitat (s. auch 7.1.2): Das Pseudotetrasaccharid und vermutlich ebenso die längerkettigen Abkömmlinge haben das Potential, sowohl die Aktivität von Maltose/Maltodextrin-Importsystemen von Nahrungskonkurrenten zu stören als auch über diese Transportkomplexe tatsächlich transloziert zu werden **(6)**. Im Zytoplasma angekommen, führen sie zu toxischen Effekten, die neben einer Akkumulation aufgrund mangelnder Enzymausstattung zum Abbau der Pseudozucker auch den Maltodextrin-Katabolismus betreffen **(6)**. Die Zellen der Nahrungskonkurrenten sind nicht mehr in der Lage, Energiestoffwechsel zu betreiben und sterben ab. Dies konnte für *E. coli* gezeigt werden (s. 6.1). Zusammengenommen könnte also der Vorteil, den sich *Actinoplanes* sp. durch die Biosynthese von Acarbose verschafft, auf einem **(A) ausgedehnten physiologischen Hemmspektrum der Acarbose** beruhen, welches die Exoenzyme und den Wachstumsstatus ganzer Zellen von konkurrierenden Mikroorganismen umfasst. HEMKER ET AL. (2001) betrachten Acarbose als „prodrug“, die auch durch die katalytische Aktivität der durch sie gehemmten Enzyme in effektivere Varianten mit z. B. zwei oder mehr Acarviosyl-Resten umgesetzt wird. So entstehen Acarbose-Homologe mit einem breiteren Hemmspektrum und damit können noch effektiver ökologische Nischen besetzt werden. Dies erscheint sinnvoll, denn *Actinoplanes* zeigt im Vergleich z. B. zu *Bacillus subtilis* ein langsames Wachstum (pers. Mitteilung U. Wehmeier). Dieser der Wirkung von Antibiotika vergleichbare Effekt würde eine aufwendige Biosynthese von Acarbose rechtfertigen.

Durch den Hemmmechanismus geht ein Teil der Pseudooligosaccharide verloren und steht dem Acarboseproduzenten nicht mehr als C-Quelle zur Verfügung (Carbophor-Funktion, s. auch Seite 111). Den Verlust an energiereichen Maltosyl- bzw. Maltodextrinylresten kann *Actinoplanes* sp. durch den ursprünglich geforderten und durch diese Arbeit bewiesenen **(B) Maltose/Maltodextrin-Import** wieder ausgleichen (s. auch 7.2.3 und Abbildung 7.2). Hier anknüpfend kann eine weitere Lücke im ursprünglichen Modell des Acarbose-Metabolismus geschlossen werden. Nämlich die Frage nach dem Verbleib der durch die Aktivität der Acarviosyl-Transferase AcbD freigesetzten Maltooligosaccharide aus Acarbose und Derivaten. Dem erweiterten Modell entsprechend stehen die entlassenen Moleküle den anderen Organismen aus dem Habitat aufgrund ihrer gehemmten Transportsysteme ebenso

wenig wie die nach Stärkehydrolyse resultierenden Maltooligosaccharide als C-Quelle zur Verfügung. Vielmehr könnten die Maltooligosaccharide über den Import in Zellen von *Actinoplanes* sp. (7) entweder recycelt oder dem Katabolismus zugeführt wird.

Neben dem Hemmcharakter im Ökosystem wurde für Acarbose auch eine Rolle als Carbophor diskutiert. Die ursprünglich postulierte **(C) Beteiligung des ABC-Transportsystems AcbHFG an der Aufnahme von Acarbose und den verlängerten Homologen (8 + 3)** kann aufgrund der für das Bindeprotein AcbH ermittelten Substratspezifität für diese Substanzen unterstützt werden (s. 6.5). Eine Beteiligung des genannten Transportkomplexes am Maltose/Maltodextrin-Import (7) kann hingegen ausgeschlossen werden, da AcbH nicht über eine Maltodextrin-Bindekapazität verfügt und außerdem unter den für die Transportmessungen gewählten Wachstumsbedingungen von *Actinoplanes* sp. nicht zur Proteinausstattung der Zellen gehört (vgl. Abbildungen 6.6 und 6.25).

Die **Carbophor-Funktion von Acarbose** allerdings kann aus drei Gründen gegenüber dem effektiven Hemmcharakter im Ökosystem von *Actinoplanes* sp. als sekundär betrachtet werden. (i) Die extrazelluläre Fixierung von Glukose-Einheiten an Acarviosin und deren Aufnahme über den AcbHFG-Transportkomplex stellt einen indirekten Importmechanismus über den Umweg eines Intermediatzustandes dar. Bei *Klebsiella oxytoca* ist ein ähnliches Szenario realisiert. Trotz einer Aufnahmekapazität für lineare Maltodextrine besitzen die Zellen zusätzlich das Cym-ABC-Transportsystem für α - und β -Cyclodextrine, die durch eine Cyclodextrin-Glukanyltransferase aus linearen Maltodextrinen erst gebildet werden. So wie in diesem Fall der Maltodextrin-Transporter keine Spezifität mehr für Cyclodextrine zeigt (PAJATSCH *ET AL.*, 1998), konnte auch für das Acarbose-Bindeprotein AcbH von *Actinoplanes* sp. eine Affinität für Maltodextrine ausgeschlossen werden (s. 6.5). Die Carbophor-Funktion kann bei Import der verschiedenen Acarbosederivate, den es noch nachzuweisen gilt, zwar einen Nettogewinn an Glukose bieten. Dennoch sollte *Actinoplanes* sp. bei Wachstum auf Stärke in der Lage sein, auch ohne „Glukose-Falle“ (WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004) ausreichend verstoffwechselbares Substrat für erfolgreiches Wachstum zu importieren (7).

(ii) Darüber hinaus wurden nur niedrige Affinitäten des Substrat-Bindeproteins AcbH für Acarbose und verschiedene höhere Homologe festgestellt (s. 6.5). Ähnlich niedrige Affinitäten zeigt die ATase AcbD zu den Substraten Acarbose (Acarviosyl-Donor) und Maltose (Acarviosyl-Akzeptor) (HEMKER *ET AL.*, 2001). Dass hier Maltose im Vergleich zu Maltodextrinen den effektivsten Acarviosyl-Akzeptor darstellt (anzumerken ist, dass

Messansätze zu dieser Reaktion erst nach 18stündiger Inkubation gestoppt werden), ist im Sinne der Carbophor-Funktion nicht ökonomisch. So kann neben dem direkten Maltose/Maltodextrintransport (7) und in Relation zum aufwendigen Acarbose-Metabolismus, der *Actinoplanes* sp. unter anderem der Erschließung von Energiequellen dienen soll, kein für das Wachstum bedeutender Nettogewinn an Glukosemolekülen mehr realisiert werden.

Zur Unterstützung der für AcbH gefundenen Substratspezifität wurden Experimente zur Aufnahme radioaktiv markierter Acarbose (5,7 μ M) in 72 Stunden alte, intakte Zellen durchgeführt. Zwar befand sich *Actinoplanes* sp. zu dieser Zeit in der stationären Wachstumsphase, bei Zellen aus der exponentiellen Phase jedoch konnte das Acarbose-Bindeprotein immunologisch nicht nachgewiesen werden. Für die Bindung von Acarbose an AcbH wurde eine Affinitätskonstante (K_D) von 3,8 mM ermittelt. Die Transportmessungen erfolgten also weit unterhalb der notwendigen Substratkonzentration. Für das Maltose-ABC-Transportsystem MalEFGK₂ von *E. coli* (K_m = 1 μ M) waren die verwendeten Acarbose-Konzentrationen ausreichend, eine dem Maltoseimport entsprechende Transportrate nachzuweisen (s. Seite 45, Abbildung 6.1). Möglicherweise spricht auch dieser Befund dafür, dass die nur niedrigen Affinitäten des ABC-Transportsystems AcbHFG aus *Actinoplanes* sp. tatsächlich physiologisch sind und die Aufnahme des Carbophors gegenüber der Hemmwirkung im Habitat nur sekundär ist.

(iii) Ein Teil der mit Glukose-Einheiten beladenen Carbophor-Moleküle geht durch den Hemmmechanismus verloren und steht dem Acarboseproduzenten nicht mehr als C-Quelle zur Verfügung (s. auch Seite 110).

Möglicherweise dient das Transportsystem AcbHFG vielmehr einem Recycling der Pseudooligosaccharide, so dass die Energie überschüssig exportierter Moleküle dem produzierenden Organismus *Actinoplanes* sp. wieder zugeführt wird. Ähnlich dem Mechanismus des „quorum sensing“ (SCHAUDER & BASSLER, 2001) könnten die Zellen dabei freie Sekundärmetabolite im Habitat und damit die Populationsdichte der Nahrungskonkurrenten erkennen.

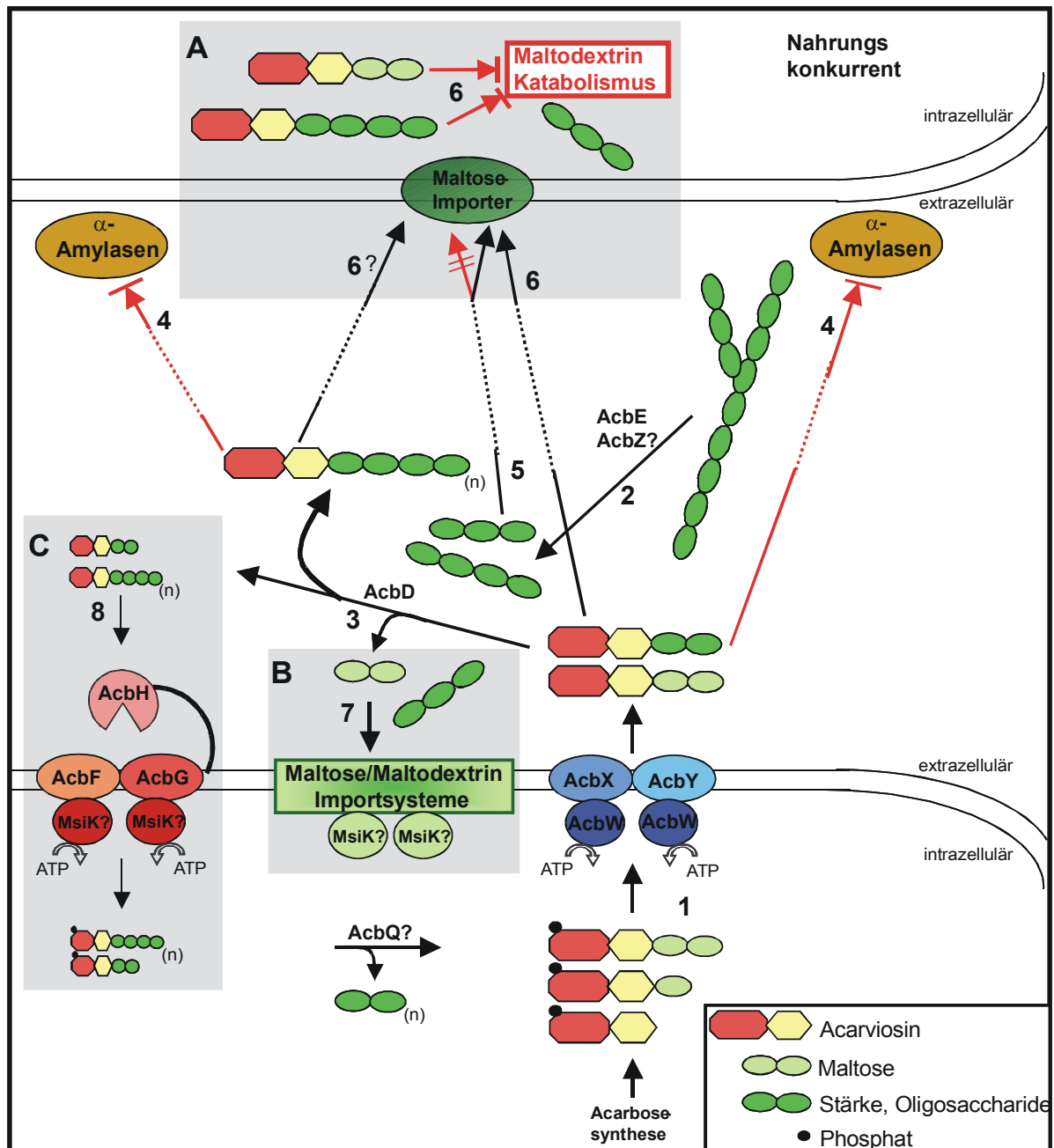


Abbildung 7.3: Erweitertes Modell des Acarbose-Metabolismus. Die durch die vorliegende Arbeit aufgezeigten Befunde (A-C) sind grau hinterlegt. Die Vermutung einer Beteiligung des ABC-Transporters AcbHFG an der Aufnahme von Acarbose und höheren Homologen konnte unterstützt werden (C). Die als sekundär bewertete Carbophor-Funktion der Acarbose, die das AcbHFG-System benötigt, ist durch schmale Pfeile und kleinere Symbole gekennzeichnet. Freie Maltose oder Maltodextrine bzw. auch die durch AcbD aus der Acarbose entlassene Maltose werden wahrscheinlich über zwei Maltose/Maltodextrin-ABC-Systeme importiert (B) (vgl. Abbildung 7.2). Die assistierende ABC-Domäne aller drei Transporter könnte das MsiK-Protein sein. Das ausgedehnte Hemmspektrum der Pseudooligosaccharide auf die Importsysteme und den Maltodextrin-Katabolismus von Nahrungskonkurrenten ist durch die roten Pfeile sowie den in rot dargestellten Katabolismus signalisiert (A). Dabei sind zwei mögliche Mechanismen dargestellt: Entweder die Pseudooligosaccharide verhindern die Maltodextrinaufnahme durch Verstopfung der Translokationspore und/oder Belegung des Substrat-Bindeproteins. Oder aber sie werden alternativ zu Maltooligosacchariden importiert.

8. AUSBLICK

Für zukünftige Arbeiten zum Verständnis des Acarbose-Metabolismus ist es unerlässlich, verschiedene Deletionsmutanten zu untersuchen. Genetische Manipulationen von *Actinoplanes* sp. sind allerdings zur Zeit noch nicht möglich. Vielversprechend in diesem Sinne ist der Eingriff in die Cosmid-kodierte heterologe Acarbose-Produktion in *S. lividans* (U. Wehmeier). Insbesondere die Deletion der Gene des ABC-Transportkomplexes AcbHFG könnte die Relevanz dieses Systems aufzeigen und damit den postulierten Acarbosekreislauf verifizieren. In diesem Zusammenhang sollten Transportexperimente mit einer Substratkonzentration durchgeführt werden, die dem ermittelten K_D -Wert von 3,8 mM für die Bindung von Acarbose an das AcbH-Protein entsprechen. Ebenso wichtig ist der Nachweis eines Imports radioaktiv markierter Acarbosederivate. Diese Untersuchungen sollten vergleichend mit *Actinoplanes* sp. und den Cosmid-tragenden Zellen von *S. lividans* unternommen werden.

Interessant wären hier auch Experimente zum Einfluss der längerkettigen AcarboseHomologe auf den Maltose/Maltodextrintransport bzw. Stoffwechsel von *E. coli*. Damit könnte der in dieser Arbeit aufgezeigte und von HEMKER *ET AL.* (2001) spekulierte ausgedehnte Hemmmechanismus der Acarbosevarianten weiter untermauert werden.

MsiK kann nach gemeinsamer Synthese mit den Membranproteinen AcbFG über (His)₆-AcbF gereinigt werden. Die Ausbildung eines funktionellen Komplexes ist daher nicht unwahrscheinlich. Daher sollte das System AcbFG-MsiK₂ in der definierten Umgebung von Proteoliposomen im Hinblick auf ATPase- und Transportaktivität näher charakterisiert werden. Das ABC-Protein MalK des Maltosetransporters von *E. coli* erfährt im rekonstituierten Komplex in Proteoliposomen eine Stimulierung der ATPase-Aktivität nur in Verbindung mit einer Substrattranslokation (REICH-SLOTKY *ET AL.*, 2000; LANDMESSER *ET AL.*, 2002). So kann die ATPase-Aktivität Aufschluss darüber geben, ob ein funktionelles Transportsystem vorliegt.

LITERATUR

- Agarraberes, F. A. and Dice, J. F. (2001). Protein translocation across membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1513: 1 – 24
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement IV, J. P., Boyd III, A. E., Gonzales, G., Herrera, H., Nguy, K., Bryan, J. and Nelson, D. A. (1995). Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423 – 426
- Ames, G. F.-L., Mimura, C. S. and Shyamala, V. (1990). Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: traffic ATPases. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 429 – 446
- Ames, G. F.-L., Liu, C. E., Joshi, A. K. and Nikaido, K. (1996). Liganded and unliganded receptors interact with equal affinity with the membrane complex of periplasmic permeases, a subfamily of traffic ATPases. *J. Biol. Chem.* 271: 14264 – 14270
- Babcock, M. J. and Kendrick, K. E. (1988). Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170: 2802 – 2808.
- Bergmeyer, H. U. (1974). Methods of enzymatic analysis, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothaft, H., Saier, M. H. and Titgemeyer, F. (2004). *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186: 1362 – 1373
- Bohl, E., Shuman, H. A. and Boos, W. (1995). Mathematical treatment of the kinetics of binding protein dependent transport systems reveals that both the substrate loaded and unloaded binding proteins interact with the membrane components. *J. Theor. Biol.* 172: 83 – 94
- Boos, W. and Lucht, J. M. (1996). Periplasmic binding-protein-dependent ABC-transporters. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, pp. 1175 – 1209. Neidhardt, F. C. et al., (ed.) 2nd ed. ASM Press, Washington D. C.
- Boos, W. and Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system in *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204 – 229
- Brooker, R. J. (1990). The lactose permease of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 141: 309 – 316
- Brunkhorst, C. (1998). Vergleichende Untersuchungen zum Maltose-Transport bei *Escherichia coli* K12 und *Actinoplanes* sp. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
- Brunkhorst, C., Andersen, C. and Schneider, E. (1999). Acarbose, a pseudooligosaccharide, is transported but not metabolized by the maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 2612 – 2619
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104: 541 - 555
- Castanié, M. P., Bergès, H., Oreglia, J., Prère, M. F., Fayet, O. (1997). A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 254: 150 - 152.
- Collins, F. S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774 – 779

- Daugherty, D. L., Rozema, D., Hanson, P. E. and Gellman, S. H. (1998). Artificial chaperone-assisted refolding of citrate synthase. *J. Biol. Chem.* 273: 33961 – 33971
- Dassa, E. and Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152: 211 – 229
- Dean, D. A., Hor, L.-I., Shuman, H. A. and Nikaido, H. (1992). Interaction between maltose binding protein and the membrane associated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6: 2033 – 2040
- Dean, D. A., Reizer, J., Nikaido, H. and Saier, M. H. (1990). Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 265: 21005 – 21010
- Death, A. and Ferenci, T. (1993). The importance of the binding protein dependent Mgl system to the transport of glucose in *Escherichia coli* growing on low sugar concentrations. *Res. Microbiol.* 144: 529 – 537
- De Bernardez Clark, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157 – 163.
- De Bernardez Clark, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 202 – 207.
- Decker, K., Peist, R., Reidl, J., Kossmann, M., Brand, B. and Boos, W. (1993). Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of the maltose system. *J. Bacteriol.* 175: 5655 – 5665.
- Degwert, U., van Hülst, R., Pape, H., Herrold, R. E., Beale, J. M., Keller, P. J., Lee, J. P. and Floss, H. G. (1987). Studies on the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose: valienamine, a m-C₇N unit not derived from shikimate pathway. *J. Antibiot.* 40: 855 – 861
- Diaz-Guardamino, U. P. M. (2000). Untersuchungen zum Einbau des Stickstoffes in der Acarviose-Einheit der Acarbose bei *Actinoplanes* sp. 50/110: die Aminotransferase AcbV. Dissertation, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal
- Distler, J., Mansouri, K. and Piepersberg, W. (1985). Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. II: Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 30: 151 – 154.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U. F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevilla, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W. and Raynal, M.-C. (2000). Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* 264: 477 – 485
- Drepper, A. (1997). Charakterisierung und mögliche Funktion ungewöhnlicher Kinasen des Acarbose Produzenten *Actinoplanes* sp. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster
- Drepper, A. and Pape, H. (1996). Acarbose 7-phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: purification, properties and possible physiological function. *J. Antibiot.* 49: 664 – 668
- Dulley, J. R. and Grieve, P. A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry methods of protein determination. *Anal. Biochem.* 64: 136 – 141.
- Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiol.* 7: 315 – 319
- Ehrmann, M. and Boos, W. (1987). Identification of endogenous inducers of the *mal* regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 3539 – 3545.

- Elferink, M. G. L., Albers, S.-V., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (2001). Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC-transporters. *Mol. Microbiol.* 39: 1494 – 1503
- Elvers, D. (2002). Biochemische Charakterisierung der ABC-Transportproteine AcbF, AcbG und MsiK aus *Actinoplanes* sp. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
- Fekkes, P. and Driessen, A. J. M. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 161 – 173
- Ferenci, T. and Klotz, U. (1978). Affinity chromatography of the periplasmic maltose binding protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 94: 213 – 217
- Fetch, E. E. and Davidson, A. L. (2002). Vanadate-catalysed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 9685 – 9690
- Frommer, W., Puls, W. and Schmidt, D. (1977b). Process for the production of a saccharase inhibitor. German patent DE 2209834 (US patent 4,019,960)
- Frommer, W., Puls, W., Schaefer, D. and Schmidt, D. (1975). Glucoside-hydrolase enzyme inhibitors. German patent DE 2064092 (US patent 3,876,766)
- Frommer, W., Junge, B., Keup, U., Müller, L. and Schmidt, D. (1977a). Amino sugar derivatives. German patent DE 2347782 (US patent 4,062,950)
- Goldsmith, E. J., Fletterick, R. J. and Withers, S. G. (1987). The three dimensional structure of acarbose bound to glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 262: 1449 – 1455
- Gottesman, M. M. and Ambudkar, S. V. (2001). Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 453 – 458
- Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385 – 427
- Gräfe, U. (1992). Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York
- Greller, G., Horlacher, R., DiRuggiero, J. and Boos, W. (1999). Molecular and biochemical analysis of MalK, the ATP-hydrolyzing subunit of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* 274: 20259 – 20264
- Hall, J. A., Gehring, K. and Nikaido, H. (1997a). Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. Correlation with the structure of ligands and the structure of binding protein. *J. Biol. Chem.* 272: 17605 – 17609
- Hall, J. A., Ganesan, A. K., Chen, J. and Nikaido, H. (1997c). Two modes of the ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. Functional significance in active transport. *J. Biol. Chem.* 272: 17615 – 17622
- Hall, J. A., Thorgeirsson, T. E., Liu, J., Shin, Y.-K. and Nikaido, H. (1997b). Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. Electron paramagnetic resonance study of ligand-induced global conformational changes by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* 272: 17610 – 17614
- Hamaker, K. H., Liu, J., Seely, R. J., Ladisch, C. M. and Ladisch, M. R. (1996). Chromatography for rapid buffer exchange and refolding of secretory leukocyte protease inhibitor. *Biotechnol. Prog.* 12: 184 – 189.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557 – 580.
- Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (1990). Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & sons, Ltd.
- Heiker, F. R., Böshagen, H., Junge, B., Müller, L. and Stoltefuß, J. (1981). Studies designed to localize the essential structural unit of glycoside-hydrolase inhibitors of the acarbose type. In: Creutzfeld, W. (ed): first international symposium on acarbose, pp. 137 – 141, Amsterdam: Excerpta Medica
- Hekstra, D. and Tommassen, J. (1993). Functional exchangeability of the ABC-proteins of the periplasmic binding protein-dependent transport system Ugp and Mal of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6546 – 6552
- Hemker, M. (1997). Pseudooligosaccharide und Stärkestoffwechsel bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal
- Hemker, M., Stratmann, A., Goeke, K., Schröder, W., Lenz, J., Piepersberg, W. and Pape, H. (2001). Identification, cloning, expression and characterisation of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase AcbD from *Actinoplanes* sp. Strain SE50. *J. Bacteriol.* 183: 4484 – 4492
- Herrmann, A. (2000). Identifizierung und Charakterisierung eines Bindeprotein-abhängigen Maltose-Transportsystems bei dem extremophilen grampositiven Bakterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin
- Herrmann, A., Schlösser, A., Schmid, R. and Schneider, E. (1996). Biochemical identification of a lipoprotein with maltose-binding activity in the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Res. Microbiol.* 147: 733 – 737
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67 – 113
- Hobson, A. C., Weatherwax, R. and Ames, G. F.-L. (1984). ATP-binding sites in the membrane components of the histidine permease, a periplasmic transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7333 – 7337
- Hopwood, D. A. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Horlacher, R. and Boos, W. (1997). Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *J. Biol. Chem.* 272: 13026 – 13032
- Horlacher, R., Xavier, K. B., Santos, H., DiRuggiero, J., Kossmann, M. and Boos, W. (1998). Archeal binding protein-dependent ABC transporter: molecular and biochemical analysis of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* 180: 680 – 689
- Hueck, C. J. and Hillen, W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol. Microbiol.* 15: 395 – 401
- Hülsmann, A., Lurz, R., Scheffel, F. and Schneider, E. (2000). Maltose and maltodextrin transport in the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* is mediated by a high-affinity transport system that includes a maltose-binding protein tolerant to low pH. *J. Bacteriol.* 182: 6292 – 6301
- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. and Morosoli, R. (1995). A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 17: 367 – 377
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. and Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362 – 365
- Jensen, P. R., Dwight, R. and Fenical, W. (1991). Distribution of Actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 1102 – 1108

- Jensen, J. B., Kent Peters, N. and Bhuvaneswari, T. V. (2002). Redundancy in periplasmic binding protein dependent transport systems for trehalose, sucrose and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 2978 – 2986
- Kamionka, A. and Dahl, M. K. (2001). *Bacillus subtilis* contains a cyclodextrin-binding protein which is part of a putative ABC-transporter. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 55 - 60
- Kempf, B., Gade, J. and Bremer, E. (1997). Lipoprotein from osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: Purification of the glycine betaine protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.* 179: 6213 – 6220
- Klein, W. and Boos, W. (1993). Induction of the λ receptor is essential for the effective uptake of trehalose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 1682 – 1686
- Konings, S. M., Albers, S.-V., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (2002). Sugar transport in (hyper)thermophilic archaea. *Res. Microbiol.* 153: 61 – 67
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landmesser, H., Stein, A., Blüschke, B., Brinkmann, M., Hunke, S. and Schneider, E. (2002). Large-scale purification, dissociation and functional reassembly of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK₂) of *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Acta* 1565: 64 – 72
- Lee, S., Sauerbrei, B., Niggemann, J. and Egelkrou, E. (1997). Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: source of the maltose unit. *J. Antibiot.* (Tokyo) 50: 954 – 960
- Lengeler, J. W. (1993). Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box? *Antonie van Leeuwenhoek* 63: 275 – 288
- Locher, K. P., Lee, A. T. and Rees, C. (2002). The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296: 1091 – 1098
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 – 275.
- Mar Carrió, M. and Villaverde, A. (2000). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters* 489: 29 – 33
- Mar Carrió, M. and Villaverde, A. (2003). Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters* 537: 215 – 221
- Martin, S. A. and Russell, J. B. (1987). Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2388 – 2393
- Martin, G., Alloing, C. B. and Claverys, J.-P. (1989). The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae* *mal* and *ami* loci in *Escherichia coli*: toxicity of *malX* and *amiA* gene products. *Gene* 80: 227 – 238
- Merino, G. and Shuman, H. A. (1997). Unliganded maltose-binding protein triggers lactose transport in an *Escherichia coli* mutant with an alteration in the maltose transport system. *J. Bacteriol.* 179: 7687 – 7694
- Middelberg, A.P.J. (2002). Preparative protein folding. *Trends in Biotech.* 20: 437 – 443
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 354
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Miroux, B. and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260: 289 – 298.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H. and Bukau, B. (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 18: 6934 – 6949.
- Moore, J. T., Uppal, A., Maley, F. and Maley, G. F. (1993). Overcoming inclusion body formation in a highlevel expression system. *Protein Expression Purif.* 4: 160 - 163.
- Mosser, J., Douar, A.-M., Sarde, C.-Q., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. and Aubourg, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC-transporters. *Nature* 361: 726 – 730
- Mourez, M., Hofnung, M. and Dassa, E. (1997). Subunit interaction in ABC transporters. A conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases define sites of interaction with the helical domain of ABC subunits. *EMBO J.* 16: 3066 – 3077.
- Müller, L. (1989). Chemistry, biochemistry and therapeutic potential of microbial α -glucosidase inhibitors, p.p. 109 – 116. In A. L. Demain, G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Creva and H. W. Rossmore (ed). Novel microbial products for medicine and agriculture. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands
- Müller, L., Junge, B., Frommer, W., Schmidt, D. D. and Truscheit, E. (1980). Acarbose (Bayg5421) and homologous α -glucosidase inhibitors from actinoplanaceae. In Brodbeck, U. (ed). Enzyme inhibitors. p.p. 109 – 122. Verlag Chemie, Weinheim
- Nanavati, D., Noll, K. M. and Romano, A. H. (2002). Periplasmic maltose- and glucose-binding protein activities in cell-free extracts of *Thermotoga maritima*. *Microbiol.* 148: 3531 – 3537
- Nelson, K. E., Eisen, J. A. and Fraser, C. M. (2001). Genome of *Thermotoga maritima* MSB8. In Methods in Enzymology, Hyperthermophilic Enzymes, part A, pp. 169 – 180. Edited by M. W. W. Adams and R. M. Kelly. San Diego, CA: Academic Press.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R. und 26 weitere Autoren (1999). Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323 – 329
- Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Engineering* 12: 3 – 9
- Nieto, C., Espinosa, M. and Puyet, A. (1997). The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 272: 30860 – 30865
- Nieto, C., Puyet, A. and Espinosa, M. (2001). MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter P_M. *J. Biol. Chem.* 276: 14946 – 14954
- Nossal, N. G. and Heppel, L. A. (1966). The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* 241: 3055 – 3062.
- Nothaft, H., Parche, S., Kamionka, A. and Titgemeyer, F. (2003). In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185: 929 – 937
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.-C., Renault, P., Bolotin, A. and Mistou, M.-Y. (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J. Bacteriol.* 181: 6238 – 6246

- Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Joshi, A. K., Ames, G. F.-L. and Kim, S. H. (1993). 3-dimensional structures of the periplasmic lysin/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* 268: 17648 – 17649
- Pajatsch, M., Gerhart, M., Peist, R., Horlacher, R., Boos, W. and Böck, A. (1998). The periplasmic cyclodextrin binding protein CymE from *Klebsiella oxytoca* and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *J. Bacteriol.* 180: 2630 – 2635
- Parche, S., Schmid, R. and Titgemeyer, F. (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*: Identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur. J. Biochem.* 265: 308 – 317.
- Parenti, F. and Coronelli, C. (1979). Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 389 – 411.
- Pospiech, A. and Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* 11: 217 – 218.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (ed. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger), pp. 1149 – 1174. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Puyet, A., Ibáñez, A. M. and Espinosa, M. (1993). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* maltosaccharide regulator MalR, a member of the LacI-GalR family of repressors displaying distinctive genetic features. *J. Biol. Chem.* 268: 25402 – 25408
- Quioco, F. A. and Ledvina, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* 20: 17 – 25
- Quioco, F. A., Spurlino, J. C. and Rodseth, L. E. (1997). Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* 5: 997 – 1015
- Rauenbusch, E. and Schmidt, D. (1978). Verfahren zur Isolierung von (O{4,6-Dideoxy-4[1s-(1,4,6/5)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethyl-2-cyclohexen-1-yl]-amino- α -D-glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-Glukopyranose) aus Kulturbrühen. Deutsches Patent DE 2719912 (Process for isolating glucopyranose compound from culture broths; US patent 4,174,439)
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M. H. and Hillen, W. (1998). A novel bacterial protein kinase that controls carbon catabolite repression. *Mol. Microbiol.* 27: 1157 – 1170
- Richarme, G. and Kepes, A. (1983). Study of binding protein-ligand interaction by ammonium sulfate-assisted adsorption on cellulose esters filters. *Biochim. Biophys. Acta* 742: 16 – 24.
- Roth, J. R. (1970). Genetic techniques in studies of bacterial metabolism. *Methods Enzymol.* 17: 3 - 35
- Russell, R. R. B., Aduse-Opoku, J., Sutcliffe, I. C., Tao, L. and Ferretti, J. J. (1992). A binding protein-independent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J. Biol. Chem.* 267: 4631 – 4637
- Saier, Jr., M. H. (2000). Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* 35: 699 – 710
- Saier, Jr., M. H. and Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol. Microbiol.* 13: 755 – 764

- Saier, Jr., M. H., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J. and Ye, J.-J. (1996). Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiol. 142*: 217 – 230
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saurin, W., Hofnung, M. and Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol. 48*: 22 – 41
- Schäfer, G. (1999). Acarbose-Stoffwechsel bei *Actinoplanes* sp.: Heterologe Expression von Genen (*acbF*, *acbG*, *msiK_{A,spec.}*) eines potentiellen Zucker-Transporters in *E. coli* sowie Versuche zur Sekretion von Acarbose. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
- Schauder, S. and Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes & Development 15*: 1468 – 1480
- Scheffel, F. (2004). Untersuchung zu Struktur und Funktion von ABC-Transportern aus thermophilen Prokaryoten. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin
- Scheffel, F., Fleischer, R. and Schneider, E. (2004). Functional reconstitution of a maltose ATP-binding cassette transporter from the thermoacidophilic gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta 1656*: 57 – 65
- Schlösser, A. (1999). MsiK-dependent trehalose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiol. Lett. 184*: 187 – 192
- Schlösser, A. and Schrempf, H. (1996). A lipid-anchored binding protein is a component of an ATP-dependent cellobiose/-triose transport system from the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Eur. J. Biochem. 242*: 332 – 338
- Schlösser, A., Aldekamp, T. and Schrempf, H. (2000). Binding characteristics of CebR, the regulator of the *ceb* operon required for cellobiose/cellotriose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiol. Lett. 190*: 127 – 132
- Schlösser, A., Kampers, T. and Schrempf, H. (1997). The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *J. Bacteriol. 179*: 2092 – 2095
- Schlösser, A., Weber, A. and Schrempf, H. (2001). Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. *FEMS Microbiol. Lett. 196*: 77 – 83
- Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K. and Schrempf, H. (1999). Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol. 65*: 2636 – 2643
- Schmidt, D. D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W. and Truscheit, E. (1977). α -glucosidase inhibitors: new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften 64*: 535 – 536
- Schneider, E. (2000). ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit 2*: 90 – 98
- Schneider, E. (2001). ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Res. Microbiol. 152*: 303 – 310
- Schneider, E. (2003). Import of solutes by ABC-transporters – the maltose and other systems. In: ABC proteins: From bacteria to man. Holland, E. B., Cole, S., Kuchler, K. and Higgins, C. (eds.) pp. 157 – 185, Elsevier, Amsterdam

- Schneider, E. and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 1 – 20
- Schneider, E. and Walter, C. (1991). A chimeric nucleotide-binding protein, encoded by a *hisP-malK* hybrid gene, is functional in maltose transport in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 5: 1375 – 1383.
- Schneider, E., Freundlieb, S., Tapio, S. and Boos, W. (1992). Molecular characterization of the MalT-dependent periplasmic α -amylase of *Escherichia coli* encoded by *malS*. *J. Biol. Chem.* 267: 5148 – 5154
- Schneider, R. and Hantke, K. (1993). Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein-dependent transport system. *Mol. Microbiol.* 8: 111 – 121
- Schönert, S., Buder, T. and Dahl, M. K. (1998). Identification and enzymatic characterisation of the maltose-inducible α -glucosidase MalL (sucrase-isomaltase-maltase) of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 2574 – 2578
- Schulz, G. E. (1996). Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 485 – 490
- Schwartz, M. (1987). The maltose regulon. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, pp. 1482 – 1502. Neidhardt, F. C. et al., (ed.) 2nd ed. ASM Press, Washington D. C.
- Schwermann, B., Pfau, K., Liliensiek, B., Schleyer, M., Fischer, T. and Bakker, E. P. (1994). Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. *Eur. J. Biochem.* 226: 981 – 991
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. and Quijcho, F. A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochem.* 31: 10657 – 10663
- Shilton, B. H., Flocco, M. M., Nilson, M. and Mowbray, S. L. (1996). Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribose-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 264: 350 – 363
- Simonen, M. and Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57: 109 – 137
- Stolpe, T. (2001). Zur Bildung von Pseudooligosaccharidyl-Trehalosen durch *Actinoplanes* sp. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Stratmann, A. (1997). Identifizierung eines Acarbose-Biosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Acarbose-Stoffwechsels. Dissertation, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal
- Stratmann, A., Mahmud, T., Lee, S., Distler, J., Floss, H. G. and Piepersberg, W. (1999). The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C₇-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinase synthases and is involved in the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose. *J. Biol. Chem.* 274: 10889 – 10896
- Strokopytov, B., Penninga, D., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B. W. (1995). X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry* 34: 2234 – 2240
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219: 37 – 44
- Studier, F. W. and Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113 – 130
- Stülke, J. and Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 195 – 201

- Sutcliffe, I. C. and Russell, R. R. B. (1995). Lipoproteins of Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 177: 1123 – 1128
- Sutcliffe, I. C., Tao, L., Ferretti, J. J. and Russell, R. R. B. (1993). MsmE, a lipoprotein involved in sugar transport in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 175: 1853 – 1855
- Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T. J. and Boos, W. (1976). Maltose transport in *Escherichia coli* K12. A comparison of transport kinetics in wild-type and λ -resistant mutants with the dissociation constants of the maltose binding protein as measured by fluorescence quenching. *Eur. J. Biochem.* 65: 13 – 19
- Tam, R. and Saier, M. H. (1993). Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 320 – 346
- Tangney, M., Fleming, A. B., Jørgensen, P. L. and Priest, F. G. (1998). Regulation of maltose metabolism in stationary phase cultures of an asporogenous mutant of *Bacillus licheniformis*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 201 – 206
- Tangney, M., Smith, P., Priest, F. G. and Mitchell, W. J. (1992). Maltose transport in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1821 – 1827
- Thomson, J., Liu, Y., Sturtevant, J. M. and Quioco, F. A. (1998). A thermodynamic study of the binding of linear and cyclic oligosaccharides to the maltodextrin-binding protein of *Escherichia coli*. *Biophys. Chem.* 70: 101 – 108
- Titgemeyer, F. and Hillen, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59 – 71
- Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M. H., Cui, X. and Saier, M. H., Jr. (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* 141: 51 – 58
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S. and van Dijk, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 515 – 547
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Treptow, N. A. and Shuman, H. (1985). Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein-recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J. Bacteriol.* 163: 654 – 660
- Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D. D. and Wingender, W. (1981). Chemistry and biochemistry of α -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 20: 744 – 761
- van Wezel, G. P., White, J., Bibb, M. J. and Postma, P. W. (1997b). The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* 254: 604 – 608
- van Wezel, G. P., White, J., Young, P., Postma, P. W. and Bibb, M. J. (1997a). Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of a *lacI-galR* family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* 23: 537 – 549
- Vobis, G. (1989). Section 28 Actinoplanetes. In: S. T. Williams, M. E. Sharp and J. G. Holt (eds): Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 2418 – 2428.
- Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L. and Schrempf, H. (1989). Identification of a mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2653 – 2657

- Walker, J. E., Saraste, M., Rundswick, M. J. and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunit of the ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J. 1*: 945 – 951
- Walter, C. (1992). Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion der ATP-bindenden Untereinheit MalK des Maltose-Transportsystems aus *Salmonella typhimurium*. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Wassenberg, D., Liebl, W. and Jaenicke, R. (2000). Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *J. Mol. Biol. 295*: 279 – 288
- Wehmeier, U. F. (2003). The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* SE50/110: A progress report. *Biocat. Biotrans. 21*: 279 – 284
- Wehmeier, U. F. and Piepersberg, W. (2004). Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 63*: 613 – 625
- Wilken, S., Schmees, G. and Schneider, E. (1996). A putative helical domain in the MalK subunit of the ATP-binding-cassette transport system for maltose of *Salmonella typhimurium* (MalFGK₂) is crucial for interaction with MalF and MalG. A study using the LacK protein of *Agrobacterium radiobacter* as a tool. *Mol. Microbiol. 22*: 655 – 666
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J. C. A. and Jakob, U. (2000). Heating greatly speeds Coomassie Blue staining and destaining. *BioTechniques 28*: 426 – 432.
- Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. and Santos, H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol. 178*: 4773 – 4777
- Yannisich-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene 33*: 103 – 119
- Yoon, S.-H. and Robyt, J. F. (2002). Addition of maltodextrins to the nonreducing-end of acarbose by reaction of acarbose with cyclomaltohexaose and cyclomaltodextrin glucanyltransferase. *Carb. Res. 337*: 509 – 516
- Zielinski, F. (2003). MalR – der negative Regulator des Genclusters für den Stärkestoffwechsel aus dem grampositiven Bakterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.1: Struktur des Sekundärmetaboliten Acarbose.....	10
Abbildung 4.2: Modell des Acarbose-Metabolismus (verändert nach STRATMANN, 1997; WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004).....	11
Abbildung 4.3: Struktureller Aufbau von ABC-Transportern (verändert nach SCHNEIDER, 2000).....	14
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Maltose-Importsysteme von Prokaryoten (verändert nach SCHNEIDER, 2003).....	17
Abbildung 4.5: Alignment der Signatursequenzen von Bindeproteinen.....	20
Abbildung 5.1: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB5.....	32
Abbildung 5.2: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB10.....	32
Abbildung 5.3: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB11.....	33
Abbildung 5.4: Konstruktion des Expressionsplasmids pCB12.....	33
Abbildung 5.5: Prinzip der Biomolekularen Interaktions-Analyse.....	41
Abbildung 6.1: Aufnahme von Acarbose über das Maltosetransportsystem von <i>E. coli</i> K12.....	45
Abbildung 6.2: Einfluss von Acarbose auf die Bindung von Maltose an MalE von <i>E. coli</i> K12.....	46
Abbildung 6.3: Freisetzung von Glukose durch die Amylomaltase MalQ und die Maltodextrin-Glukosidase MalZ in Gegenwart von Acarbose.....	48
Abbildung 6.4: Wachstum des Stammes <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29 mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	50
Abbildung 6.5: Aufnahme von Maltose in Zellen des Stammes <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29 – Darstellung der Linearität.....	51
Abbildung 6.6: Durchschnittliche Maltoseaufnahme in Zellen von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29.....	52
Abbildung 6.7: Inhibierung der Maltoseaufnahme durch verschiedene Zucker.....	54
Abbildung 6.8: Bestimmung der kinetischen Parameter des Maltosetransports.....	56
Abbildung 6.9: Durchschnittliche Maltotrioseaufnahme in Zellen von <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29.....	58
Abbildung 6.10: Inhibierung der Maltotrioseaufnahme durch verschiedene Zucker.....	59
Abbildung 6.11: Isolierung eines potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins.....	61
Abbildung 6.12: DNA-DNA-Hybridisierung.....	64
Abbildung 6.13: Nachweis der heterologen Expression von <i>acbH</i> in <i>S. lividans</i> TK23 <pCB12> und Reinigung des (His) ₁₀ -AcbH-Fusionsproteins über Ni-Affinitätschromatographie.....	71
Abbildung 6.14: Überprüfung einer Maltodextrin-Bindeaktivität von (His) ₁₀ -AcbH.....	72
Abbildung 6.15: Nachweis der heterologen Expression von <i>acbH</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) <pLysS, pCB10>.....	73
Abbildung 6.16: Denaturierende Reinigung und Renaturierung des (His) ₁₀ -AcbH-Fusionsproteins aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) <pLysS, pCB10>.....	74
Abbildung 6.17: CD-Spektrum des renaturierten AcbH.....	75
Abbildung 6.18: Wirkung von Acarbose auf den Renaturierungserfolg von (His) ₁₀ -AcbH.....	76
Abbildung 6.19: Sensorgramme der Interaktion von AcbH mit Acarbose und Nebenkompenten.....	77
Abbildung 6.20: Sensorgramme der Interaktion von AcbH mit den Nebenkompenten 5C, 6AB.....	78
Abbildung 6.21: Nachweis der heterologen Synthese von MsiK in <i>E. coli</i> JM109 <pDE03> sowie denaturierende Reinigung und Renaturierung (verändert nach ELVERS, 2002).....	80
Abbildung 6.22: Ko-Elution des Komplexes AcbFG-MsiK ₂ (verändert nach ELVERS, 2002).....	81
Abbildung 6.23: Expression von wt- <i>acbH</i> in <i>Actinoplanes</i> sp. bei Anzucht in AcarboseProduktionsmedium.....	83

Abbildung 6.24: Expression von wt- <i>acbH</i> in <i>Actinoplanes</i> sp. bei Anzucht in 0,5 % Maltodextrinen.	83
Abbildung 6.25: Expression von wt- <i>acbH</i> in <i>Actinoplanes</i> sp. bei Anzucht mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.	84
Abbildung 6.26: Solubilisierung des wt- <i>AcbH</i> aus Membranen von <i>Actinoplanes</i> sp.	85
Abbildung 7.1: Maltodextrinabbau durch die zytoplasmatischen Enzyme MalQ, MalP und MalZ (verändert nach BOOS & SHUMAN, 1998).	89
Abbildung 7.2: Mögliche Ausstattung von <i>Actinoplanes</i> sp. mit ABC-Transportern für Maltose und Maltodextrine.	103
Abbildung 7.3: Erweitertes Modell des Acarbose-Metabolismus.	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 5.1: Liste der Bakterienstämme	24
Tabelle 5.2: Liste der Plasmide	27
Tabelle 5.3: Liste der Oligonukleotide	28
Tabelle 6.1: Kinetische Parameter des Maltosetransports bei <i>Actinoplanes</i> sp. 223/29	56
Tabelle 6.2: Strukturelle Unterschiede der Nebenkompenten im Vergleich zu Acarbose.	77
Tabelle 7.1: Kinetische Parameter verschiedener ABC-Transportsysteme für Maltose/Maltodextrine.	94

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Erwin Schneider für die engagierte Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und seine Offenheit.

Ich danke Prof. Dr. Piepersberg und PD Dr. Udo Wehmeier für die gute Zusammenarbeit, den regen Gedankenaustausch und die ständige Hilfsbereitschaft, insbesondere während der Anfangszeit. Ebenso bedanke ich mich bei U. Wehmeier und PD Dr. Thomas Eitinger für die Übernahme des Gutachtens.

Bei Prof. Dr. Lockau und Dr. Dreier bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, als Mitglieder des Promotionsausschusses zur Verfügung zu stehen. Prof. Ehwald danke ich für die Leitung des Promotionsausschusses.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Sophie Haebel für die sehr interessante Zusammenarbeit zur Analyse des potentiellen MBP bedanken. Außerdem danke ich Dr. Margitta Dathe und Frau Nikolenko für die Aufnahme und Auswertung des CD-Spektrums.

Heidi Landmesser und Sabine Hunke standen immer mit Rat und Tat zur Seite, insbesondere bei der Bewältigung des Laboralltages und penetranter Computerangelegenheiten. Ohne Heidi gäbe es keine Geburtstagsfrühstücke und schönen Grillabende im blühenden Garten. Danke!

Dr. Anke Stein ist mir eine gute Freundin geworden. Ihre beruhigende Art tat und tut immer sehr gut. Dr. Kelvin Eckert und Dr. Frank Scheffél danke ich für wissenschaftliche und persönliche Witzeleien. Es hat sehr viel Spaß und Freude bereitet, mit Euch zu arbeiten und zu lachen.

Bettina Blüschke und Martin Mayer danke ich für die wirklich tolle Arbeitsatmosphäre im Labor 224 und die anregenden Kaffee- und Mittagspausen. Bettina machte mich mit dem BIAcore-Gerät vertraut und half bei den Studien zur Substratspezifität des AcbH. Danke! Dirk Elvers danke ich für die engagierte Durchführung seiner Projekt- und Diplomarbeit.

Sybille Striegl danke ich für ihre liebevoll dominante Art und viele gereifte Lebensweisheiten.

Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung.

„Hm, ich kann gar nicht angeben mit Praktika...“. „Wieso, schreib doch einfach von deiner Zeit mit Watson & Crick und den acht Wochen bei Craig Venter...“! Josh, Du kannst mich so wunderbar zum Lachen bringen und vieles mehr.

ANHANG

Peptidsequenzen des potentiellen Maltose/Maltodextrin-Bindeproteins

LDNFYAPASVQ(Cys)WK

ASTDEVTAPALDGY(Cys)SHHPTGDR (fishing MBP)

GNVDAVLSGGTA

DG(Q/K)NTDLSFTK

AVLTGNTYYDWK

NFYDPYSW (fishing MBP2)

ALLGATELGAVDLG

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Brunkhorst
Geburtstag: 11.11.1969
Geburtsort: Soltau
Adresse: Schlegelstrasse 5
10115 Berlin
E-Mail: claudia.brunkhorst@gmx.de

Schulbildung

1976-1980 Grundschole I Schneverdingen
1980-1982 Kooperative Gesamtschole Schneverdingen, Orientierungsstufe
1982-1987 Kooperative Gesamtschole Schneverdingen, Gymnasialzweig
1987-1991 Gymnasium Soltau
1991 Abitur
1986 einjähriger Auslandsaufenthalt als Austauschschülerin
in Australien, Melbourne

Hochschulausbildung

1992-1994 Grundstudium Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald, Abschluss Vordiplom
1994-1998 Hauptstudium Biologie an der Freien Universität Berlin
1996-1998 Studentische Hilfskraft in der Abteilung Bakterienphysiologie am
Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin
1998 Diplomarbeit zum Thema: „Vergleichende Untersuchungen zum
Maltosetransport bei *Escherichia coli* K12 und *Actinoplanes* sp.“
in der Abteilung Bakterienphysiologie am Institut für Biologie der
Humboldt-Universität zu Berlin, Abschluss Biologie Diplom

Beruflicher Werdegang

1998-2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung
Bakterienphysiologie am Institut für Biologie der Humboldt-
Universität zu Berlin (Arbeiten zur vorliegenden
Dissertationsschrift), gefördert durch „Berliner Programm zur
Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und
Lehre“ (05.2002-10.2003)

Berlin, den 10.08.2004

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt habe.

Berlin, den 10.08.04